Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Universität Göttingen

Differenzierungsmuster und Regulationsvorgänge im Enzymsystem von Roggenkeimlingen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität
zu Göttingen

vorgelegt von
Jürgen Feierabend
aus Bremerhaven

Göttingen 1965

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544314_0030

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Universität Göttingen

Differenzierungsmuster und Regulationsvorgänge im Enzymsystem von Roggenkeimlingen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität
zu Göttingen

vorgelegt von
Jürgen Feierabend
aus Bremerhaven

Göttingen 1965

D 7

Referent: Professor Dr. A. Pirson
Korreferent: Professor Dr. A. Trebst

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 1965

Inhaltsübersicht

Einleitung

Material und Methodik

Versuche und Ergebnisse
A. Das Endosperm
I. Aktivitätsverlauf von Enzymen des Endosperms während der Keimung
II. Verteilung der Enzymaktivitäten auf die Gewebe des Endosperms
B. Der Embryo
I. Untersuchungen über die spezifische enzymatische Ausstattung der Organe des Embryos
II. Veränderungen in der Aktivität der Enzyme des Embryos während der Keimung
1. Amylasen
2. Enzyme der Glykolyse
3. Enzyme des Tricarbonsäure-Zyklus
4. Enzyme des Aminosäurestoffwechsels
5. Abschließende Betrachtung des Verhaltens der spezifischen Aktivitäten
6. Einfluß des Lichts
III. Verlauf der Aktivität von Enzymen des Calvin- und des Pentosephosphat-Zyklus und Untersuchungen zu deren Regulation während der Keimung
1. Enzyme des Calvin-Zyklus
a) Enzyme des Calvin-Zyklus in Dunkelkeimlingen
b) Der Einfluß von Dauerlicht auf die Aktivität von Enzymen des Calvin-Zyklus
2. Proteinverhältnisse in Licht- und Dunkelkeimlingen
3. Charakterisierung der Wirkung des Lichts auf die Enzyme des Calvin-Zyklus als Einfluß über das Phytochromsystem
a) Nachweis des HR-DR-Systems
b) Der Einfluß längerer Bestrahlung mit dunkelrotem oder blauem Licht

4. Verlauf der Aktivität von Enzymen des Pentosephosphat-Zyklus während der Keimung
   a) Verhalten der Aktivitäten der G-6-PDH, 6-PGSDH und DSSR in etiolierten Keimlingen und nach Anzucht im Dauerlicht
   b) Enzyme des Pentosephosphat- und des Calvin-Zyklus bei Anzucht der Keimlinge auf Nährlösung im Dauerlicht
5. Über Beziehungen zwischen dem Verhalten des Zwischenferments und der Enzyme des Calvin-Zyklus
   a) Hemmung des Photosyntheseapparats durch Anzucht bei tiefer Temperatur
   b) Umsetzungsversuche zur Charakterisierung des Temperatureinflusses auf die Aktivität der G-6-PDH und zur Prüfung der Abhängigkeit der Kältewirkung vom Entwicklungsstadium der Keimlinge
   c) Vergleichende Untersuchungen über das Verhalten der G-6-PDH und RuDPCO bei Sommerroggen
   d) Vergleich von Wurzel und Sproß bezüglich des Verhaltens der G-6-PDH
   e) Hemmung der Enzyme des Calvin-Zyklus durch Chloramphenicol
   f) Zusammenfassender Vergleich der Einflüsse von tiefer Temperatur, Chloramphenicol und Licht auf die Aktivität des Zwischenferments
   g) Vergleich der Wirkungen verschiedener Hemmstoffe der Proteinsynthese

Diskussion

Zusammenfassung

Literatur

Anhang

Einleitung

Die engen Beziehungen, welche die Biochemie zwischen der DNS der Gene und der Bildung von Enzymen aufgewiesen hat, lassen erwarten, daß Differenzierungsvorgänge sich auch auf der Ebene der Fermente ausprägen. Unterschiedlich differenzierte Zellen und Gewebe dürften sich daher zugleich in der Art und Menge ihrer Enzyme unterscheiden, zumal wenn sie so offensichtlich ungleiche Stoffwechselaufgaben und -fähigkeiten haben wie etwa Gewebe der Blätter und der Wurzeln. Dementsprechend sollten aber auch die Entwicklungsvorgänge, die zur Differenzierung führen, von spezifischen zeitlichen Veränderungen in der Aktivität der Enzyme begleitet sein. Als geeignete Objekte für das Studium von Beziehungen zwischen Enzymaktivität und Entwicklung bei höheren Pflanzen haben sich die Wachstumszonen von Wurzeln (ROBINSON and BROWN 1952; JENSEN 1955) und Keimlinge erwiesen; an ihnen wurde mehrfach das Verhalten verschiedener Enzyme des Grundstoffwechsels beschrieben (z.B. OOTA, YAMAMOTO and FUJII 1953; GOKSÖYR, BOERI, BONNICHSEN 1953; HASKINS 1955; BARTELS 1960; LATZKO u. KOTZÉ 1965).

Eine genauere Analyse konnten HOTTA und STERN 1961 für das entwicklungsbedingte Auftreten der Thymidinkinase liefern; dieses Ferment ist nur in Zeiten der DNS-Synthese aktiv (vgl. WANKA, VASIL, STERN 1964). Die Kenntnisse von den Regulationsvorgängen, die Bildung oder Rückgang eines Enzyms während der Entwicklung steuern, sind bei höheren Pflanzen aber noch recht gering. Zumeist wurde die Abhängigkeit der Bildung eines Enzyms von seinem Substrat oder von Außenfaktoren untersucht: die Induktion der Nitratreduktase durch Nitrat (HAGEMAN and FLESHER 1960; BEEVERS and HAGEMAN 1963), der Einfluß von Anaerobiose auf die Aktivität der Alkoholdehydrogenase (HAGEMAN and FLESHER 1960), von Licht auf die NADP-Triosephosphatdehydrogenase (MARCUS 1960). Eingehend untersucht ist auch die Induktion der Amylase durch Gibberellinsäure im Endosperm der Gerste (PALEG 1960; VARNER 1964; VARNER and CHANDRA 1964).

Der Grundstoffwechsel dürfte allerdings in seinem normalen Verlauf, soweit er nur von den Schwankungen im ganzen gleichbleibender ökologischer Bedingungen beeinflußt wird, nicht durch ständige Änderungen in den Enzymsynthesen reguliert werden; denn die Konkurrenz um das vorhandene Substrat, die Hemmung der Aktivität eines vorhandenen Enzyms durch sein Reaktionsprodukt oder den Einfluß weiterer Feed-back-Mechanismen dürften meist ausreichen, einen bestimmten Gleichgewichtszustand einzuhalten. Veränderungen in der Aktivität von Enzymen aufgrund von Änderungen in der Enzymbildung und damit wahrscheinlich in der Aktivität der entsprechenden Gene sind daher nur bei grundsätzlichen Umstellungen des Stoffwechsels zu erwarten. Eine solche tiefgreifende Änderung des Stoffwechseltyps stellt bei einer Pflanze der Wechsel vom heterotrophen zum autotrophen Zustand dar. Die vorliegende Arbeit befaßt sich daher mit Veränderungen und Regulationsvorgängen im Enzymsystem von Keimlingen beim Übergang von der heterotrophen Wachstumsphase, die für die Keimung charakteristisch ist, in den autotrophen Zustand der jungen Pflanze.

Material und Methodik

a) Material und Anzucht

Die Versuche wurden an Keimlingen von Petkuser Winterroggen (Normal 908 der Fa. F. v. Lochow-Petkus, Hasselhorst) der Ernte 1963 durchgeführt. Nur in einem Vergleichsversuch wurde Sommerroggen (1422 obiger Fa.; Ernte 1964) verwendet. Das Saatgut wurde bei 10° trocken gelagert. Es wurden nur gesunde Karyopsen etwa einheitlicher Größe aussortiert und noch mindestens eine Woche vor dem Versuch bei 10° dunkel aufbewahrt.

Zu Versuchsbeginn wurden die Samen in einem (in den Versuchen über den Einfluß des Lichts verdunkelten) Erlenmeyerkolben mit 3% iger Chlorkalklösung im Exsikkator kurz evakuiert und ca. eine Std. oberflächlich sterilisiert. Anschließend wurden die Samen mit dest. Wasser mehrfach

gewaschen und auf zwei Lagen Filtrierpapier (Schleicher & Schüll Nr. 598) in Petrischalen von 10 (8 ml H_2O) bzw. 12 cm (11 ml H_2O) ausgelegt; wenn nicht anders angegeben, wurden die Schalen mit Austauscherwasser beschickt. Bei den Versuchen über den Einfluß des Lichts auf Enzyme der Photosynthese wurden die Samen in grünem Sicherheitslicht ausgelegt. Bei den Versuchen mit tiefer Temperatur und Hemmstoffen wurden das Wasser bzw. die Lösungen der Hemmstoffe und die Schalen mit dem Papier vor dem Versuch sterilisiert. Bei langfristigen Versuchen wurden drei Lagen Filtrierpapier verwendet und entsprechend eine ausreichende Menge Wasser zugegeben. Die in einem Versuch verwendete Knop'sche Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung: 1000 ml H_2O; 1,0 g $Ca(NO_3)_2$;250 mg KNO_3; 250 mg KH_2PO_4; 120 mg KCl; 250 mg $MgSO_4$x 7 H_2O; eine Spur $FeSO_4$ x 7 H_2O.

Die Anzucht erfolgte normalerweise im Thermostaten bei 22°C, bei Versuchen mit Dauerlicht in einer Klimakammer bei 22°. In den Versuchen mit tiefer Temperatur wurden die Keimlinge im Kälteraum bei ca. 2°C aufgezogen.

b) Lichtquellen

Dauerweißlicht wurde mit Leuchtstoffröhren der Fa. Osram (abwechselnd HNI - de Luxe 202, 40 W und HNW 202, 40 W) erzeugt. Die Beleuchtungsstärke betrug in den normalen und auch in den Kälteversuchen ca. 1000 Lux.

Als Lichtquellen für monochromatisches Licht dienten für den Rotbereich eine Leitz Bestrahlungsanlage für Glühlampen (modifizierter Prado), für blaues Licht eine Xenon-Hochdrucklampe (Osram XBO 501, 450 W). Es wurden Interferenzfilter der Fa. Schott & Gen. für die angegebenen Wellenlängen benutzt. Die Energiebeträge des Lichts wurden mit Hilfe von Thermosäule und Galvanometer (Fa. Kipp, Delft, Holland) bestimmt und nach Bedarf eingestellt.

c) Bereitung der Extrakte

Bei der Aufarbeitung wurden die Keimlinge in Endosperm und Embryo aufgeteilt. Der Einfachheit halber wurde die Bezeichnung "Embryo" auch in den fortgeschrittenen Keimungsstadien für die endospermfreie junge Pflanze beibehalten.

In einigen Fällen wurde der "Embryo" weiter auseinandergeschnitten in 1. den sogen. "Sproß" (= der Komplex aus gestauchter Achse + Vegetationskegel + Blätter + Koleoptile), 2. Wurzelbüschel und 3. Scutellum.

Die Herstellung der Extrakte erfolgte bei ca. 2°. Das zu untersuchende Material wurde mit Austauscherwasser gewaschen und mit Puffer in einem vorgekühlten Mörser zerrieben; Anschließend wurde mit Pufferlösung auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt (gewöhnlich entsprechend 0,5 - 1 Embryo pro ml Extrakt). Für die Enzyme: Aldolase, ADH, LDH, ICDH, MDH, PEPCO, GPT, GOT, Amylase [+)] wurden die Extrakte mit 0,1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7,4, hergestellt und nach dem Auffüllen auf die gewünschte Extraktmenge noch anschließend 2 min unter Eiskühlung mit dem Zellhomogenisator Ultra-Turrax (TP 18/2 der Fa. Janke & Kunkel KG, Stauffen i. Br.) homogenisiert. Zum Test der Enzyme G-6-PDH, 6-PGSDH, RPI, Transketolase, RuDPCO, DSSR, GlDH wurden die Extrakte mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, bereitet und nur im Mörser homogenisiert (nur zum Test der GlDH wurde der Extrakt mit dem Ultra-Turrax nachbehandelt). Die rohen Homogenate wurden durch eine Glasfritte (3 G 1 der Fa. Schott & Gen.) gesaugt und anschließend 20 min auf der Kühlzentrifuge von M. Christ "Universal Rapid" bei ca. 35000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde im Eisbad gehalten und diente zur Bestimmung der Enzymaktivitäten und des Proteins.

Bemerkungen zum Aufschluß mit dem Zellhomogenisator Ultra-Turrax

Einige Enzyme erwiesen sich als besonders empfindlich gegenüber einer Behandlung mit dem Zellhomogenisator Ultra-Turrax. DSSR ist danach im Embryo überhaupt nicht mehr nachzuweisen. G-6-PDH wird in Extrakten des Embryos sehr stark denaturiert, was durch das Schäumen verursacht werden könnte. Im Folgenden sind die Aktivitäten der G-6-PDH zusammengestellt, die in einem Extrakt nach verschiedener Behandlung gemessen werden konnten:

[+)] Verzeichnis der Abkürzungen s. Anhang

Aufschluß	Aktivität/Embryo
Mörser	164 m/uM/Embryo
" + 1 min Ultra-Turr.	96 "
" + 2 min "	33 "

6-PGSDH wird wesentlich weniger beeinträchtigt. In Extrakten des Endosperms wird auch die Aktivität der G-6-PDH durch Behandlung mit dem Zellhomogenisator nicht vermindert.

Parallel zur Inaktivierung bestimmter Enzyme wird bei der Behandlung der Extrakte mit dem Ultra-Turrax auch Protein ausgefällt. Für einen 120 Std. alten Embryo wird aus dem Extrakt nach Aufschluß durch Zerreiben im Mörser ein Proteingehalt von 1,27 mg bestimmt, nach zusätzlicher Behandlung mit dem Ultra-Turrax von nur 0,96 mg.

d) Bestimmungsmethoden

Enzymtests s. Anhang

Protein

Das lösliche Protein wurde aus den Extrakten nach Fällung mit Trichloressigsäure (25 % Endkonzentration) als Protein-Stickstoff mit der Mikro-Kjeldahl-Methode bestimmt.

Zur Bestimmung von Gesamtprotein wurde aus einem mit 0,1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7,4, bereiteten, unzentrifugierten Vollhomogenat mit Trichloressigsäure gefällt. Der Niederschlag wurde mit 5 %iger Trichloressigsäure und zusätzlich dreimal mit Äthanol:Äther (3:1) nachgewaschen.

Chlorophyll

Gesamtchlorophyll wurde mit 96 %igem Methanol extrahiert und nach den Angaben von BÖGER 1964 bestimmt.

Versuche und Ergebnisse

A. Das Endosperm

I. Aktivitätsverlauf von Enzymen des Endosperms während der Keimung

Die hervorstechendsten Veränderungen, die das Endosperm während der Samenkeimung erfährt, sind die Bildung einiger abbauender, meist hydrolytischer Enzyme und parallel dazu der drastische Abbau und Abtransport von Reservestoffen z.B. auch des Proteins. Als Beispiel abbauender Enzyme wurden die Amylasen getestet; es wurde ursprünglich beabsichtigt, ihr Auftreten mit anderen Veränderungen zu vergleichen. Die Messung der Amylasen erfolgte 1. am Abbau von Amylose zu einer Form, die keine Jodfärbung mehr liefert, was der Einwirkung der α-Amylase entspricht, und 2. an der Bildung von Maltose aus Stärke, was der Gesamtamylase mit starker Bevorzugung der ß-Amylase entsprechen dürfte (= "ß-Amylase"). α-Amylase findet sich im trockenen Endosperm nur in sehr geringer Menge, während "ß-Amylase" bereits beträchtlich vorhanden ist, was mit den Angaben von DURE 1960 übereinstimmt. Die Aktivität beider Amylasen fängt erst nach 24 Std. Keimung an zuzunehmen. Die α-Amylase erreicht nach 120 Std. einen 34,5-mal höheren Wert als ihre Ausgangsaktivität, während die "ß-Amylase" nur auf das 3,5fache zunimmt (Abb. 1). Nach DURE 1960 erfolgt die Zunahme der α-Amylase bei Mais hauptsächlich durch Sekretion aus dem Scutellum, während BRIGGS 1964 angibt, daß sie bei Gerste vorwiegend im Endosperm selbst gebildet wird (vgl. auch PALEG 1960).

Im Gegensatz zu dem Verhalten der Amylasen zeigte keines der untersuchten Enzyme des Grundstoffwechsels im Endosperm eine Aktivitätszunahme während der Entwicklung (Abb. 2, Tab. I). Ihre Aktivität ist im Vergleich zum Embryo - außer bei GPT und ADH - meist relativ gering. Bemerkenswert hoch ist die Aktivität der ADH; LDH ist ebenfalls in geringer Aktivität vorhanden. Aus der Glykolyse wurde ferner Aldolase, aus dem Tricarbonsäure-Zyklus ICDH, MDH und PEPCO, außerdem GlDH und

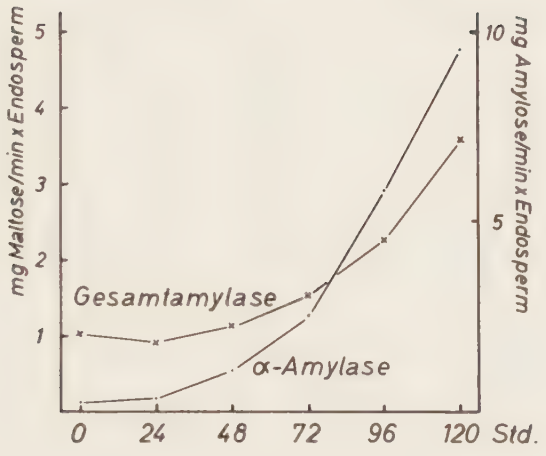


Abb. 1 Aktivität der α-Amylase und der Gesamtamylase ("ß-Amylase") des Endosperms im Verlauf der Keimung

die Transaminasen GPT und GOT als Fermente des Aminosäurestoffwechsels nachgewiesen. Aus dem Pentosephosphat-Zyklus sind G-6-PDH, 6-PGSDH und in geringer Aktivität auch Ribosephosphatisomerase vorhanden (quantitative Angaben für RPI im Endosperm sind bei der angewandten Testmethode wegen der geringen Aktivität gegenüber sehr großen Mengen extrakteigener Ketosen nicht sehr genau). Transketolase ließ sich jedoch nicht nachweisen. RuDPCO war ebenfalls nicht meßbar, Aktivität der DSSR wurde auch im Endosperm gefunden.

Die Aktivitäten aller beschriebenen Enzyme des Grundstoffwechsels nehmen im Verlauf der Keimung ab. Sie fallen aber nicht mit gleicher Geschwindigkeit dem proteolytischen Abbau anheim, sondern dieser erfolgt recht unterschiedlich. Die Aktivität einiger Enzyme sinkt in gleichem Maße, wie das lösliche Protein abgebaut wird (Aldolase, ICDH, MDH, GOT), oder sogar eher etwas schneller (PEPCO, GlDH); bei

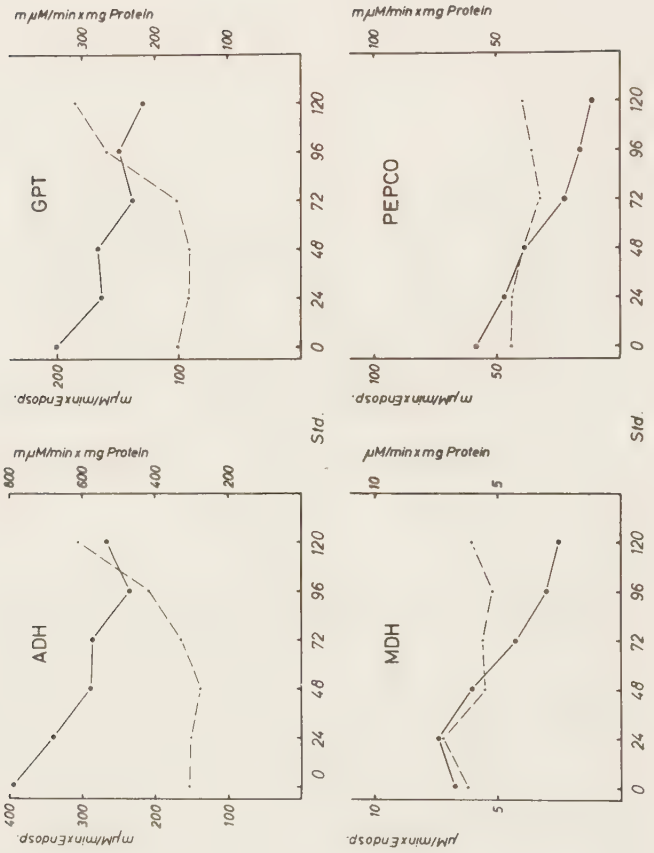


Abb. 2 Änderungen der absoluten (durchgezogene Linien) und der spez. Aktivität (unterbrochene Linien) verschiedener Enzyme im Endosperm während der Keimung im Dunkeln.

Tabelle I

Änderung der Aktivität von Enzymen im Endosperm während der Keimung
(jeweils obere Zeile: m/uM/min x Endosperm; untere Zeile: m/uM/min x mg Prot.)

Enzym	trocken	24	48	72	96	120 Std.
Aldolase	48,7	32,5	30,0	25,4	21,0	13,0
	38,3	29,7	28,4	30,7	39,4	30,7
LDH	9,7	5,9	7,3	5,3		4,5
	9,3	5,5	6,8	7,3		12,8
ICDH	48,2	44,9	46,8	25,6	24,3	21,0
	44,6	39,9	40,6	31,0	38,1	50,9
GlDH	19,4	35,7	21,9	16,7	9,7	4,1
	12,9	21,0	17,6	17,1	13,9	10,4
GOT	1493	1624	1423	1027	830	785
	1360	1476	1285	1322	1408	1920
G-6-PDH	41,6	44,4	44,5	40,8	33,1	26,5
	26,6	30,6	36,5	43,3	64,6	76,0
6-PGSDH	29,2	29,6	29,1	26,4	23,3	22,8
	19,5	20,1	24,2	29,9	48,7	57,2

anderen Fermenten nimmt die Aktivität aber auch langsamer ab als das Bezugsprotein (ADH, GPT, G-6-PDH, 6-PGSDH). Entsprechend bleibt die spezifische Aktivität, deren Verlauf diese Verhältnisse sehr eindrucksvoll veranschaulicht, konstant (Abb. 2, MDH), nimmt etwas ab (Abb. 2, PEPCO) oder nimmt zu (Abb. 2, GPT u. ADH). Dieses unterschiedliche Verhalten der spezifischen Aktivitäten verbietet zugleich den Schluß, daß zu Beginn der Keimung zunächst nur enzymatisch inaktives Reserveeiweiß abtransportiert würde. In diesem Falle müßten die spezifischen Aktivitäten aller Fermente starke Anstiege zeigen.

II. Verteilung der Enzymaktivitäten auf die Gewebe des Endosperms

Nach 48 Std. Keimung zeigen die untersuchten Enzyme außer einer gewissen Abnahme der Aktivität keine grundsätzlichen Veränderungen gegenüber dem Anfangszustand. Dieses Stadium dürfte also noch repräsentativ sein, aber das Endosperm ist bereits ausreichend erweicht, daß sich die Aleuronschicht vom Stärkeendosperm ablösen läßt. Daher wurden Aleuron und Stärkeendosperm in diesem Stadium getrennt, um zu sehen, ob ihre auffällige histologische Verschiedenheit ebenfalls von einer quantitativen oder gar qualitativen Differenzierung im Bereich der Enzyme begleitet ist. Die Aleuronschicht wurde mit Pinzette und Lanzettnadel unter gelegentlichem Nachfeuchten mit wenig Puffer vom Kern des Stärkeendosperms abpräpariert. Da Aleuron und Stärkeendosperm eines Endosperms in diesem Stadium etwa gleich viel lösliches Protein enthalten, geben die aufgetragenen spezifischen Aktivitäten zugleich auch annähernd das Verhältnis der absoluten Aktivitäten der beiden Gewebeanteile wieder. Bei der angewandten Methode der Trennung sind geringe Verunreinigungen der Aleuronschicht mit Stärkeendosperm vorhanden, die des Stärkeendospermmaterials mit Aleuronzellen sind aber höchstens minimal.

Wie aus Abb. 3 ersichtlich, sind die enzymatischen Unterschiede zwischen den Endospermgeweben teils sehr drastisch.

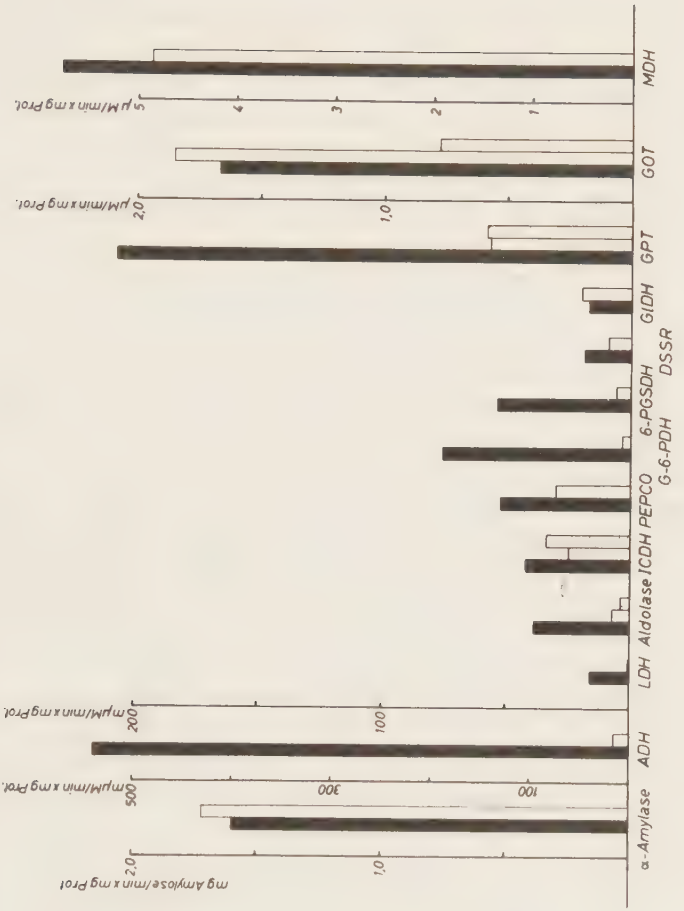


Abb. 3 Spezifische Aktivitäten verschiedener Enzyme in den nach 48 Std. Keimung getrennten Geweben des Endosperms.

- Aleuronschicht
- Stärkeendosperm
- trockenes Stärkeendospermmaterial zum Vergleich

Eine vergleichende Betrachtung zeigt, daß die Enzyme der Glykolyse ADH, LDH, Aldolase, und des Pentosephosphat-Zyklus G-6-PDH und 6-PGSDH nahezu ausschließlich im Aleurongewebe lokalisiert sind. Demgegenüber finden sich Enzyme des TCC (ICDH, MDH und PEPCO), des Aminosäurestoffwechsels (GlDH, GPT, GOT) und auch DSSR in erheblichem Maße oder sogar in gleicher Aktivität ebenfalls im Stärkeendosperm.

Auch für die α-Amylase werden etwa gleiche Werte in beiden Geweben gemessen. Das mag Anlaß zu einigen Einwänden geben, ob die Enzyme, die im Stärkeendosperm gefunden werden, dort wirklich ursprünglich sind. Nach ENGEL 1947 findet sich die ß-Amylase des ruhenden Samens in der Subaleuronschicht; das ließe sich mit der angewandten Methode nicht unterscheiden, sondern ergäbe eine Verteilung über beide Gewebe. Die Neusynthese der α-Amylase findet nach BRIGGS 1964 und VARNER and CHANDRA 1964 nur in den Aleuronzellen statt, dürfte aber von dort ins Stärkeendosperm sezerniert werden. In ähnlicher Weise könnten die Fermente des Säurestoffwechsels, die auch im Stärkeendosperm vorhanden sind, während der 48 Std. Keimung aus den Aleuronzellen selektiv dorthin abgegeben worden sein, während andere Enzyme zurückgehalten werden. Zur Prüfung dieser Frage, ob die im Stärkeendosperm nachgewiesenen Enzyme dort echt oder sekundär durch Sekretion dorthin gelangt sind, wurde trockenes Stärkeendospermmaterial untersucht. Die Aleuronschicht war in trockenem Zustand mit einem kleinen Schleifstein, wie er in der Zahntechnik gebräuchlich ist, abpoliert worden. Die geprüften Enzyme (Abb. 3) zeigen, daß das nach 48 Std. gefundene Verteilungsmuster prinzipiell repräsentativ ist. Im trockenen Stärkeendosperm findet sich Aldolase auch nur in Spuren, ICDH und GPT haben mit dem Zustand nach 48 Std. vergleichbare Werte; GOT zeigt zwar beträchtliche aber geringere Aktivität.

Glykolyse, Atmung und Pentosephosphat-Zyklus können im Stärkeendosperm offenbar nicht in relevantem Maße ablaufen. Die Aleuronzellen besitzen dagegen die Möglichkeit zur Glykolyse, die vermutlich bei der hohen Aktivität der ADH in starkem Maße in eine alkoholische Gärung auslaufen wird

aber auch in den TCC fortgesetzt werden kann. Der Pentose-phosphat-Zyklus scheint in den Aleuronzellen nicht mehr als Zyklus funktionsfähig zu sein. Es ist nur die Kette der Reaktion bis zur RPI vorhanden, so daß Ribose-5-Phosphat als letztes Produkt geliefert werden dürfte. Enzyme des Calvin-Zyklus sind nicht vorhanden.

B. Der Embryo

I. Untersuchungen über die spezifische enzymatische Ausstattung der Organe des Embryos

Bei der Behandlung des Endosperms hatte sich gezeigt, daß einige Enzyme nur in einem Gewebe lokalisiert sind, so daß dieses allein das Gesamtverhalten bestimmt. Auch im Embryo wird das Verhalten der Gesamtaktivität eines Enzyms teils vorwiegend von einem Organ beeinflußt. Daher sei eine Zusammenstellung über das organspezifische Verteilungsmuster der untersuchten Enzyme an den Anfang gesetzt.

Die Embryonen wurden in einem geeigneten Stadium, meist nach 48 bzw. 72 Std. Keimung, in 1. den "Sproß" (s. Methodik), 2. das Wurzelbüschel und 3. das Scutellum auseinandergeschnitten, und die Organe wurden getrennt getestet. Der Vergleich wird auf der Basis des löslichen Proteins vorgenommen und ist als Gegenüberstellung der spezifischen Enzymaktivitäten dargestellt. Da der Proteingehalt der Wurzeln relativ gering ist, gewinnt ein Enzym aus den Wurzeln erst dann einen dominierenden Einfluß auf die absolute Gesamtaktivität des Embryos, wenn seine spezifische Aktivität mehr als doppelt so hoch ist wie die des Sprosses.

Die unterschiedliche organspezifische enzymatische Ausrüstung, wie sie durch Tab. II veranschaulicht wird, deutet auch auf unterschiedliche Schwerpunkte und Aufgaben in den Stoffwechselsystemen der Organe. Ähnlich dem Endosperm zeichnet das Scutellum eine ungewöhnlich hohe Aktivität der ADH sowie hohe Aktivitäten an GPT und natürlich α-Amylase aus. Es stehen aber auch in erheblicher Aktivität Aldolase, Enzyme des TCC, Transaminasen und die Enzyme des Pentosephosphat-Zyklus - im Gegensatz zum Endosperm einschließlich einer relativ beachtlichen Aktivität an Transketolase - zur Verfügung. Gering ist die Aktivität der PEPCO.

Eine besonders hohe Aktivität an GlDH ist charakteristisch für die Wurzeln; es finden sich aber ebenfalls hohe Aktivitäten der Transaminasen, der Aldolase, an ICDH und PEPCO, während sich die MDH recht unspezifisch verhält. G-6-PDH und

Tabelle II

Spezifische Aktivitäten verschiedener Enzyme in den einzelnen Organen des Embryos (wenn nicht anders angegeben, von Dunkelkeimlingen). Die Zahlen unter den Namen der Enzyme geben das Keimungsalter der Embryonen in Std. an, in dem die Organe untersucht wurden.

Enzym	Sproß	Wurzeln	Scutellum	
α-Amylase (48)	0,145±0,008	0,411±0,151	0,842±0,129	mg Amylose/ min x mg Prot.
Aldolase (48)	116±5,4	304±3,5	226±15,4	m/uM/min x mg Prot.
ADH (48)	18,3±9,3	41,8±8,8	282,4±38,9	"
ICDH (48)	184±9,5	342±42	200±4,6	"
MDH (48)	13,9±0,58	14,9±1,4	21,6±2,6	/uM/min x mg Protein
PEPCO (72)	105±16	191±21	52±5,6	m/uM/min x mg Prot.
GlDH (48)	26,5±4,2	192±34	62,5±6,2	"
GOT (48)	2783±282	6335±675	4229±482	"
GPT (48)	290±30,5	493±67	728±63	"
G-6-PDH (72)	158±8,2	243±35	309±35	"
6-PGSDH (72)	133±5,9	255±35	218±13,8	"
Transketol. (72)	62,5±2,1	38,3±1,4	89,3±5,6	"
Transketol. (120 Licht)	163±2,7	70,4±5,8	97,0±10,8	"
RuDPCO (120 Licht)	53,7±2,2	0,0	0,0	"
DSSR (72)	78,5±4,2	38,8±3,2	50,7±0,96	"

6-PGSDH erreichen in der Wurzel höhere Werte als im Sproß, jedoch weist die Transketolase und ebenfalls die DSSR gegenüber Sproß und Scutellum nur die geringste Aktivität auf. Die Wurzel scheint also besonders gut ausgerüstet zu sein für die Assimilation von NH_3-Stickstoff über die GlDH und die Transaminasen; eine beträchtliche Glykolyse und der TCC mögen dazu dienen, die dafür notwendigen C-Skelette zu liefern.

Im Sproß weisen die Enzyme der Glykolyse, des TCC und des Aminosäurestoffwechsels, ebenfalls aber auch G-6-PDH und 6-PGSDH die geringste Aktivität gegenüber Wurzel und Scutellum auf. Besonders hoch ist im Sproß die Aktivität der DSSR und - vor allem nach Belichtung der Keimlinge - der Transketolase. Die Carboxydismutase, ein Enzym des Calvin-Zyklus, konnte in Keimlingen, die im Licht aufgezogen wurden, allein im Sproß nachgewiesen werden.

II. Veränderungen in der Aktivität der Enzyme des Embryos während der Keimung (Amylasen, Enzyme der Glykolyse, des TCC und des Aminosäurestoffwechsels)

1. Amylasen

Im Embryo des trockenen Samens finden sich α- und "ß-Amylase" nur in geringen Spuren, ihre Aktivität steigt aber im Verlauf der Keimung stark an (Abb. 4). Wie aus dem vorigen Abschnitt ersichtlich, dürfte die Zunahme der Aktivität der Amylasen hauptsächlich auf die Tätigkeit des Scutellums zurückzuführen sein. Ein Teil der im Scutellum gebildeten Amylase soll in das Endosperm sezerniert werden (vgl. DURE 1964; BRIGGS 1964). Nach 120 Std. Keimung ist die absolute Aktivität eines Embryos an α-Amylase etwa 4mal geringer als die des entsprechenden gleich alten Endosperms, die der "ß-Amylase" ca. 8mal geringer.

2. Enzyme der Glykolyse

Typisch für den Beginn der Keimung sind relativ erhebliche Aktivitäten an Gärungsenzymen. ADH und LDH werden im Embryo des trockenen Samens in der höchsten Aktivität gemessen. ADH tritt nach RIJVEN and COHEN 1961 im Embryo

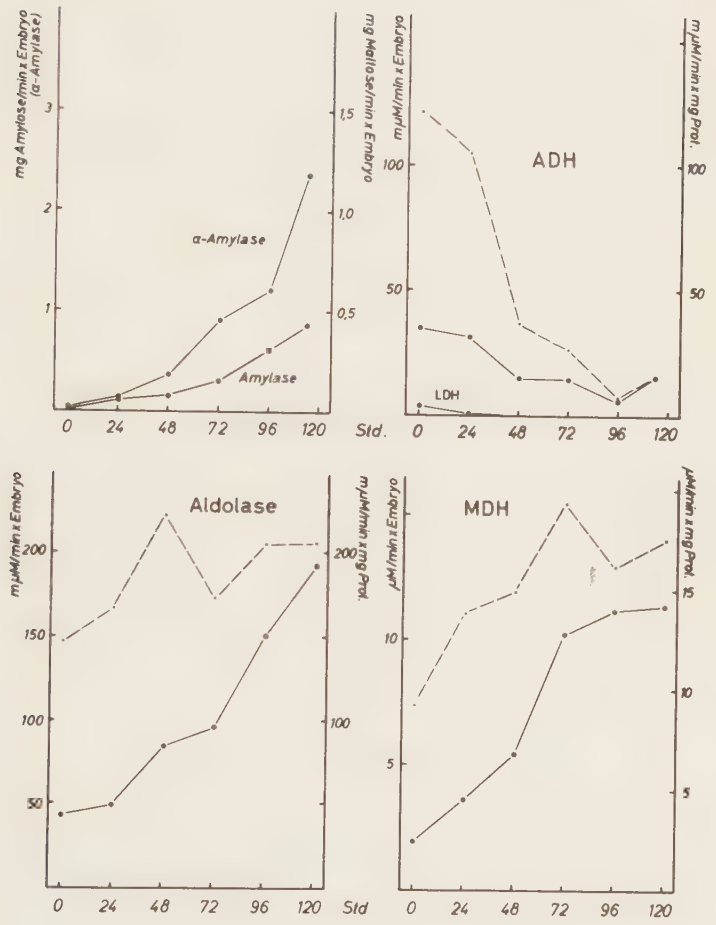


Abb. 4 Aktivitätsänderungen von Enzymen im Embryo während der Keimung im Dunkeln.

●——————● Absolute Aktivität

•— — — —• Spez. Aktivität

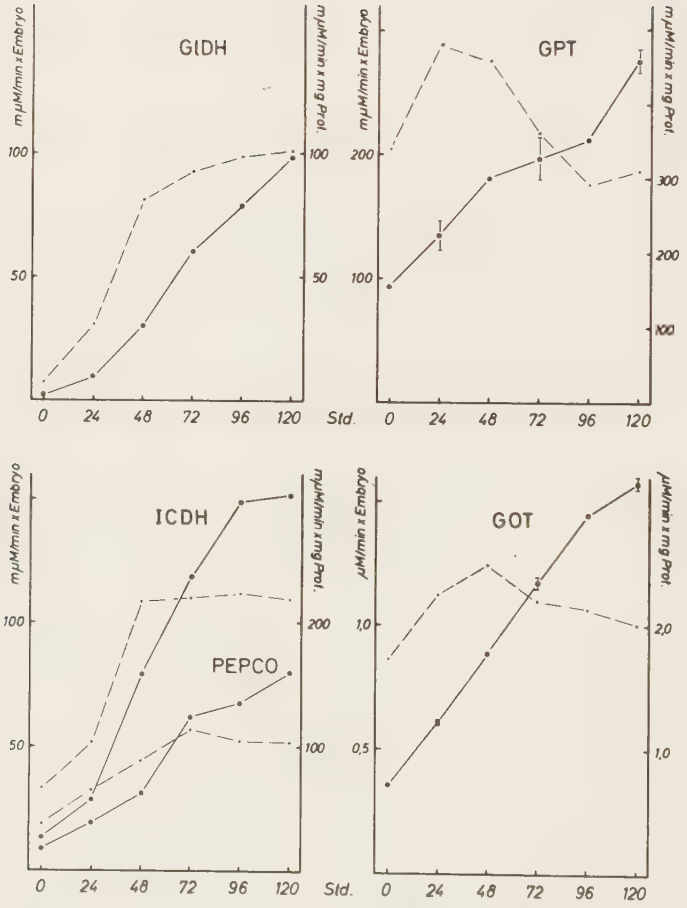


Abb. 5 Aktivitätsänderungen von Enzymen im Embryo während der Keimung im Dunkeln.

●——————● Absolute Aktivität

•— — — —• Spez. Aktivität

bereits während der Samenreifung auf. Die ohnehin sehr geringe Aktivität der LDH ist nach 24 Std. meist schon nicht mehr nachweisbar, die ADH sinkt allmählich ab (Abb. 4). Wie der Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Embryoorgane zeigte, wird die ADH des Embryos zum überwiegenden Teil vom Scutellum beigesteuert. Auch GOKSÖYR, BOERI, BONNICHSEN 1953 (ADH) und BARTELS 1960 (LDH und ADH) beschreiben an Keimlingen von Erbsen bzw. Pinus nigra das Auftreten von Gärungsfermenten in den trockenen Samen und zu Beginn der Keimung sowie einen ähnlichen Abfall ihrer Aktivität während der Entwicklung. HAGEMAN and FLESHER 1960 wiesen nach, daß sich die Aktivität der ADH durch Anaerobiose adaptiv erhöhen läßt.

Aldolase läßt sich schon aus den Embryonen trockener Samen annähernd in gleicher Aktivität extrahieren wie aus denen 24 Std. alter Keimlinge und steigt dann im Verlauf der Keimung an (Abb. 4). Die Zunahme der Enzymaktivität übertrifft zunächst die Proteinsyntheserate, so daß der Verlauf der spezifischen Aktivität nach 48 Std. ein Maximum aufweist, um dann schwach abzufallen. Die Aktivität der Phosphoglukoseisomerase nimmt während der Entwicklung ebenfalls zu.

3. Enzyme des Tricarbonsäure-Zyklus

DAVIS 1953 wies nach, daß Mitochondrien aus Erbsenkeimlingen befähigt sind, alle Reaktionen des TCC durchzuführen. Die hier behandelten Enzyme des TCC sind ähnlich der Aldolase bereits im Embryo des trockenen Samens vorhanden. Ihre Aktivität nimmt während der Keimung zu und folgt dabei weitgehend dem Verlauf einer Wachstumskurve mit einer lag-Phase zu Beginn und einem Erlahmen der Syntheserate am Ende der untersuchten Keimungsphase (vgl. z.B. ICDH, Abb. 5); nach etwa 120 Std. beginnt aber auch die Proteinsynthese infolge des Verbrauchs der Reserven zu stagnieren. Die Reaktion der PEPCO führt in den TCC, und das Enzym zeigte auch eine der ICDH ähnliche Verteilung auf die Organe. Daher wird die PEPCO hier mitbehandelt; sie verhält sich ähnlich wie die ICDH (Abb. 5). Die spezifischen Enzymaktivitäten steigen zunächst stark an und bleiben dann in einem konstanten Bereich, d.h. ihre Aktivität ändert sich dann etwa überein-

stimmend mit der Proteinzunahme. Fragwürdig ist der Sinn der ungewöhnlich hohen Aktivität der MDH (Abb. 4), die allgemein von pflanzlichem Material berichtet wird und ca. um zwei Zehnerpotenzen höher liegt als z.B. bei der ICDH und den meisten anderen Enzymen des Grundstoffwechsels.

4. Enzyme des Aminosäurestoffwechsels

GlDH ist im Embryo des trockenen Samens nur in sehr geringen Mengen nachzuweisen. Ihre Aktivität nimmt dann offenbar mit dem Wachstum der Wurzel, der sie ja nach dem Vergleich der Organverteilung zuzuschreiben ist, analog den eben beschriebenen Enzymen nach Art einer Wachstumskurve zu (Abb. 5).

GOT zeigt nach der MDH unter den gemessenen Enzymen die höchste Aktivität. Die Transaminasen sind in den Embryonen der trockenen Samen bereits in recht beträchtlicher Menge vorhanden, wie besonders deutlich auch die spezifische Aktivität zeigt; sie nehmen während der Entwicklung entsprechend zu (Abb. 5). GPT zeigt wohl infolge starker Enzymbildung im Scutellum einen besonders starken Anfangsanstieg. Die spezifische Aktivität der Transaminasen durchläuft ein Maximum um dann wieder auf die Anfangsaktivität zu sinken, d.h. umgekehrt ausgedrückt: die Transaminasen liegen zu Beginn der Keimung im trockenen Embryo in bezug auf das gesamte Enzymsystem schon in der gleichen Aktivität vor, wie sie sich dann im Laufe der Keimung einspielt. Die Keimlingsentwicklung kann also nach Imbibition mit Wasser in bezug auf GOT und GPT mit einem voll ausgebildeten Aminosäurestoffwechsel starten; die nur in Spuren vorhandene GlDH wird auch erst mit Beginn der Stickstoffaufnahme durch die Wurzel benötigt.

GlDH wurde von BULEN 1956 aus Maisblättern isoliert und charakterisiert, GOT und GPT von CRUICKSHANK and ISHERWOOD 1958 aus Weizenkeimen. Das Vorhandensein von GOT und GPT im trockenen Samen und die Zunahme der Enzyme während der Keimung berichten auch ALBAUM and COHEN 1943 und SMITH and WILLIAMS 1951. Über einen Zusammenhang der Aktivität der Transaminasen mit der Intensität der Proteinsynthese vertreten die beiden Arbeiten eine gegensätzliche Auffassung.

5. Abschließende Betrachtung des Verhaltens der spezifischen Aktivitäten

Ein Enzym, das wie GlDH im trockenen Samen nicht oder kaum vorhanden ist, muß nach seinem Auftreten natürlich zwangsläufig auch in seiner spezifischen Aktivität ansteigen. Enzyme, die bereits vorgefunden werden, brauchten aber keine grundsätzliche Veränderung des Niveaus ihrer spezifischen Aktivität mehr zu zeigen, falls sie in ausreichendem Maße vorhanden sind; das ist bei den Transaminasen auch annähernd der Fall. Bei einem großen Teil der beobachteten Enzyme (Aldolase, ICDH, PEPCO, MDH, G-6-PDH, 6-PGSDH, DSSR) steigt die spezifische Aktivität aber zu Beginn steil an und pendelt sich dann auf einem höheren Niveau ein. Dieses Verhalten liefert ein Argument für die Annahme, daß in dieser Phase, in der so viele Enzyme stärker zunehmen als das Bezugsprotein, eine stärkere Umwandlung von enzymatisch inertem Reserveprotein, das im Bezugsprotein inbegriffen war, in Enzymeiweiß erfolgt. Es vermag aber keinen hinreichenden Beweis dafür zu liefern, da nicht alle Enzyme diesen Aktivitätssprung zeigen wie z.B. die Transaminasen. Andererseits lehren die Gärungsenzyme, daß auch Enzymeiweiß abgebaut wird, und es liegt kein Anhaltspunkt dafür vor, in welchem Maße Fermente, die nur zu Beginn der Keimung eine Rolle spielen mögen, in andere umgebaut werden.

6. Einfluß des Lichts

Nach Anzucht der Keimlinge in Dauerlicht konnten in orientierenden Versuchen bei den Enzymen: Aldolase, ICDH, MDH, PEPCO, GlDH, GOT und GPT keine signifikanten Aktivitätsunterschiede beobachtet werden.

III. Verlauf der Aktivität von Enzymen des Calvin- und des Pentosephosphat-Zyklus und Untersuchungen zu deren Regulation während der Keimung

1. Enzyme des Calvin-Zyklus

Nach heutiger Auffassung stellen die Enzyme des sogen. Calvin-Zyklus den Apparat für die Dunkelreaktionen der Photosynthese dar, die Fixierung des CO_2 in Kohlenhydrat und

die Regenerierung des CO_2-Akzeptors. Carboxydismutase und NAD-Triosephosphatdehydrogenase, charakteristische Enzyme des Calvin-Zyklus, sind nach HEBER, PON u. HEBER 1963 in den Chloroplasten lokalisiert. Das Auftreten des Photosynthesesystems in Keimlingen, die im frühen etiolierten Zustand offensichtlich noch nicht zur Photosynthese befähigt sind, ist an Reaktionen aus dem Calvin-Zyklus verfolgt worden. HAGEMAN and ARNON 1955 berichten, daß die NADP-Triosephosphatdehydrogenase in den Samen nicht meßbar ist und bei Erbsenkeimlingen erst nach 10 Tagen Anzucht im Licht, speziell im Sproß lokalisiert, auftritt. TOLBERT and GAILEY 1955 verfolgten an Weizenkeimlingen das Auftreten markierter 3-Phosphoglyzerinsäure nach $^{14}CO_2$-Fixierung. In etiolierten Keimlingen wird sie nicht gefunden und tritt erst auf, nachdem diese 4 - 5 Std. dem Licht ausgesetzt waren. Sie machen wahrscheinlich, daß fehlendes RuDP der begrenzende Faktor ist. HALL et al. 1959 untersuchten eine $^{14}CO_2$-Fixierung in vitro mit rohen Homogenaten der Blätter von Gerstekeimlingen und R-5-P bzw. F-6-P als Substraten. Sie finden dabei keine direkte Korrelation mit der Chlorophyllsynthese. HUFFAKER et al. 1964 geben dann für einzelne Enzyme, RuDPCO und RPI, einen Anstieg der Aktivität nach Übertragen etiolierter Keimlinge ins Licht an. Die Reaktionen des Calvin-Zyklus wurden natürlicherweise vorwiegend auf ihre Abhängigkeit vom Einfluß des Lichts untersucht. Für die NADP-Triosephosphatdehydrogenase konnte MARCUS 1960 nachweisen, daß der Lichteinfluß über das Phytochromsystem vermittelt wird.

a) Enzyme des Calvin-Zyklus in Dunkelkeimlingen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Fermente Carboxydismutase (RuDPCO), Transketolase und RPI getestet. Während RPI und Transketolase zugleich auch im Pentosephosphat-Zyklus benötigt werden, ist die Carboxydismutase spezifisch für den Calvin-Zyklus und wird im folgenden als dafür repräsentatives Enzym behandelt.

In den Embryonen trockener Samen sind Carboxydismutase und Transketolase nicht, RPI nur in geringen Spuren nachweisbar. Das Fehlen von Transketolase - ebenso wie im Endosperm - findet eine passende Ergänzung durch die Angaben von

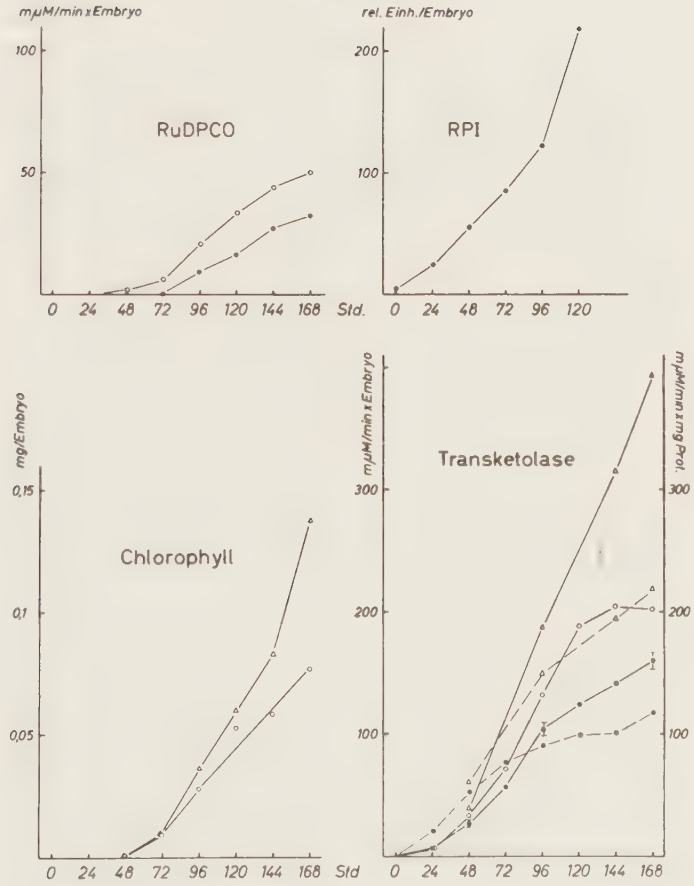


Abb. 6 Änderung der absoluten (durchgezogene Linien) und spez. Aktivität (unterbrochene Linien) von Photosyntheseenzymen bzw. des Chlorophyllgehalts im Embryo während der Keimung.

- ● Anzucht auf H_2O im Dunkeln
- ○ Anzucht auf H_2O im Dauerlicht
- △ Anzucht auf Nährlösung in Dauerlicht

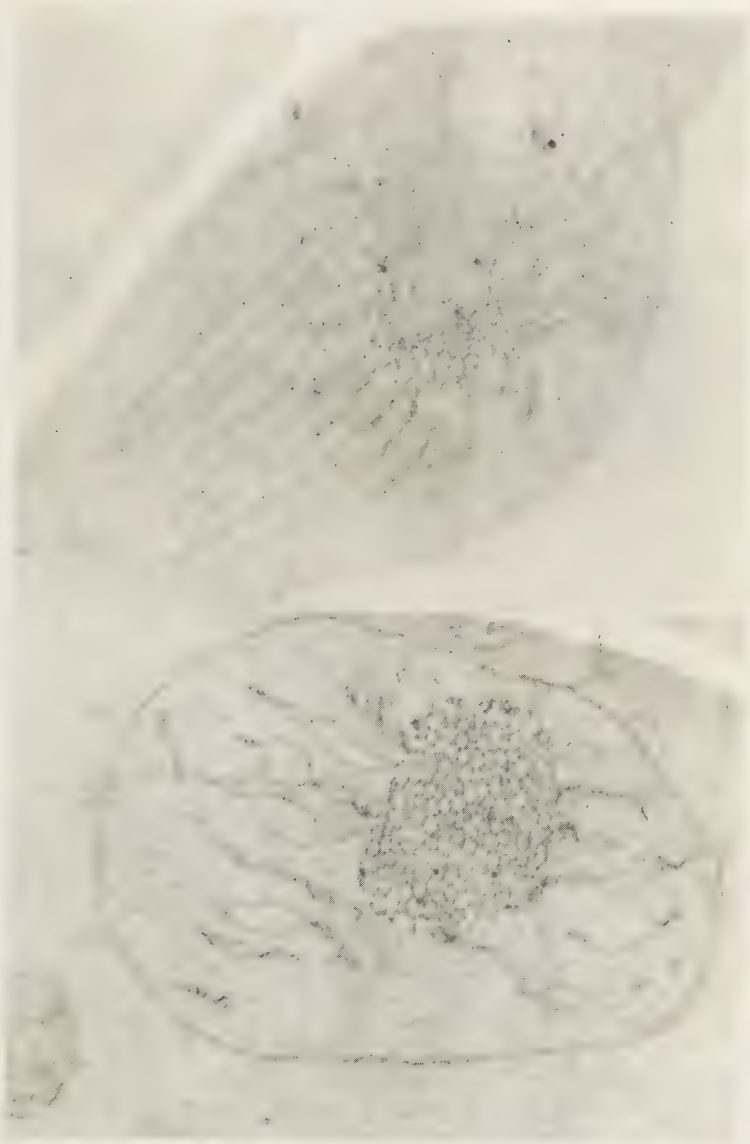
SEN u. ROBINSON 1963, daß in Samen von Getreiden das Thiamin nicht in Form von Phosphaten vorhanden ist; der Cofaktor der Transketolase, das Thiaminpyrophosphat, fehlt in den trockenen Samen also auch noch. Die Aktivitäten der RPI und Transketolase steigen nach einer anfänglichen lag-Phase im Verlauf der Keimung kräftig an (Abb. 6), während Carboxydismutase zunächst noch nicht nachweisbar ist. Nach 72 Std. Keimung beginnt dann allerdings auch in den etiolierten Keimlingen ohne Lichteinfluß RuDPCO aufzutreten und steigt in ihrer Aktivität allmählich an (Abb. 6). Auch HALL et al. 1959 schließen bereits auf das Vorhandensein von Carboxylierungsenzymen in etiolierten Keimlingen; denn die von ihnen beobachtete $^{14}CO_2$-Fixierung mit R-5-P in Extrakten etiolierter Keimlinge beträgt bereits 1/2 - 2/3 der nach Belichtung der Pflanzen maximal erreichbaren Fixierungsrate in vitro. HUFFAKER et al. 1964 finden auch in Dunkelkeimlingen bereits geringe Mengen RuDPCO, und nach den Angaben von MARGULIES 1965 ist auch die NADP-Triosephosphatdehydrogenase in etiolierten Bohnenblättern in geringer Aktivität vorhanden.

b) Der Einfluß von Dauerlicht auf die Aktivität von Enzymen des Calvin-Zyklus

Wurden die Keimlinge in Dauerlicht angezogen, so lagen die Aktivitäten der RuDPCO, Transketolase und der RPI höher als bei etiolierten Keimlingen (Abb. 6). Die Transketolase übertrifft nach Anzucht im Licht den Dunkelwert um etwa ein Drittel, die Aktivität der RuDPCO liegt nach Keimung im Licht 50 - 100 % über dem Dunkelwert. Nach 120 Std. wird ein weiterer stärkerer Anstieg der Photosyntheseenzyme durch das allmähliche Aufhören der Proteinsynthese infolge des Verbrauchs der Reservestoffe verhindert. Im Licht tritt die Carboxydismutase zugleich einen Tag eher in der Entwicklung auf (Abb. 6). Die Bildung der RuDPCO erfolgt im Dauerlicht annähernd parallel zur Chlorophyllsynthese (Abb. 6).

Für die beschriebenen drei an der Photosynthese beteiligten Enzyme ist eine Förderung durch das Licht zu beobachten. Ebenso wichtig scheint aber die Tatsache zu sein, daß das Enzymsystem des Calvin-Zyklus, repräsentiert durch die RuDPCO,

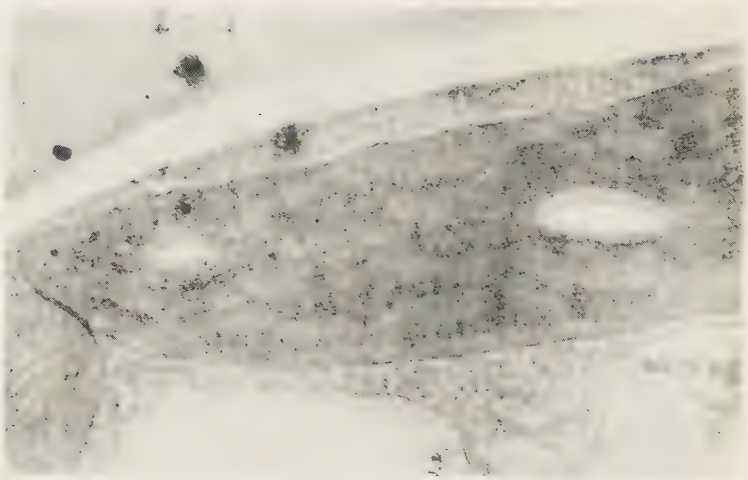
a)



b)

Abb. 7 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Proplastiden nach 120 Std. Aufzucht der Keimlinge im Dunkeln.
a) Vergr. 31000fach; Fixierung: Glutaraldehyd + OsO_4
b) Vergr. 33500fach; Fixierung: OsO_4

a)



b)

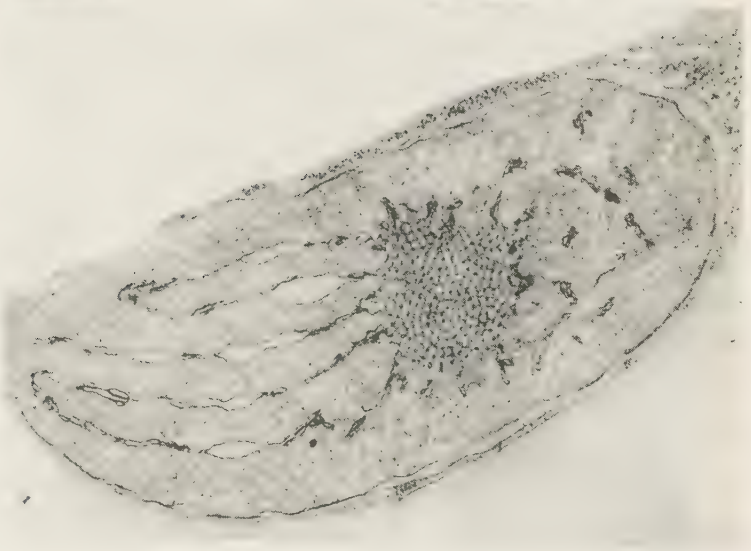


Abb. 8 Elektronenmikroskopische Aufnahmen
a) Chloroplast; 120 Std. Dauerlicht (44500fach; Glutaraldehyd + OsO_4)
b) Proplastid; nach 48, 72, 96 Std. Bestrahlung mit je 5 min HR (35000fach; OsO_4)

auch unabhängig vom Licht auftritt; auf einen induzierenden Einfluß des Lichts ist es anscheinend nicht unbedingt angewiesen. In diesem Zusammenhang wurde der strukturelle Zustand der Proplastiden elektronenmikroskopisch untersucht. Die Schnitte wurden von Blättern 120 Std. alter Keimlinge angefertigt, in denen RuDPCO auch nach Anzucht im Dunkeln bereits vorhanden ist. Wie die Abb. 7 a) zeigt, enthalten die Proplastiden etiolierter Blätter neben einem Prolamellarkörper in dem ausgedehnten Stromabereich bereits eine Reihe von Lamellen, die aber natürlich nicht nach Art der Grana zusammenliegen. Der Zustand, den die Abb. 7 a) wiedergibt, ist aber nicht ganz typisch für das normale Aussehen der Proplastiden, da der gezeigte Proplastid besonders groß ist und daher auch ungewöhnlich viele Thylakoide enthält. Zum Vergleich ist daher die Abb. 7 b) beigefügt, die zugleich eine andere Schnittrichtung zeigt. Nach Aufzucht in Dauerlicht bieten die Chloroplasten das normale Bild mit vielen Granastapeln (Abb. 8 a).

2. Proteinverhältnisse in Licht- und Dunkelkeimlingen

Die Enzyme des Calvin-Zyklus gehören zu den löslichen Enzymen. Es könnte also unter dem Einfluß des Lichts eine Erhöhung des löslichen Proteins erwartet werden. Über eine Vermehrung des Chloroplastenproteins beim Ergrünen von Blättern infolge Belichtung berichten DE DEKEN-GRENSON 1954 und MEGO und JAGENDORF 1961. Eine Erhöhung des Anteils des Protein-Stickstoffs am Gesamtstickstoff bei Belichtung von Keimlingen teilt LANDGRAF 1961 mit. HENSHALL und GOODWIN 1964 wiesen auch eine Stimulierung der Aminosäure-aktivierenden Enzyme durch Bestrahlung mit Hellrot nach. Daher sei an dieser Stelle eine Betrachtung der Proteinverhältnisse eingeschoben.

Wie eine Darstellung des pufferlöslichen, zentrifugierten Extraktproteins zeigt, nimmt dieses lösliche Protein während der Entwicklung des Keimlings in Form einer Wachstumskurve zu (Abb. 9). Am Ende der untersuchten Keimungsphase sind die Reservestoffe offensichtlich erschöpft. Es zeigt sich aber kein bemerkenswerter Unterschied im Gehalt an löslichem

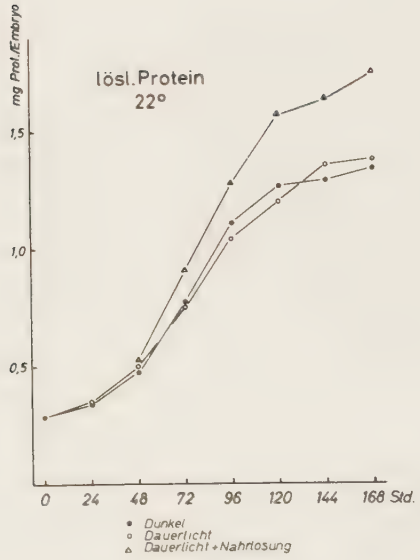


Abb. 9 Pufferlösliches Protein der Embryonen bei Anzucht auf H_2O im Dunkel und im Dauerlicht bzw. auf Knop'scher Nährlösung im Dauerlicht.

Protein zwischen im Dunkel und im Dauerlicht aufgewachsenen Keimlingen. Eine Zunahme löslicher Chloroplastenproteine könnte durch einen entsprechenden Stop oder eine Reduktion löslicher Plasmaproteine ausgeglichen werden. Eine Erhöhung des löslichen Proteins läßt sich natürlich dadurch erreichen, daß man den Keimlingen beim Wachstum im Licht eine mineralische Nährlösung bietet (Abb. 9).

Aufschlußreicher ist ein weiterer Vergleich der Stickstofffraktionen. Bei der Ausbildung des Photosyntheseapparats und der Chloroplasten sind die Blätter betroffen. Daher

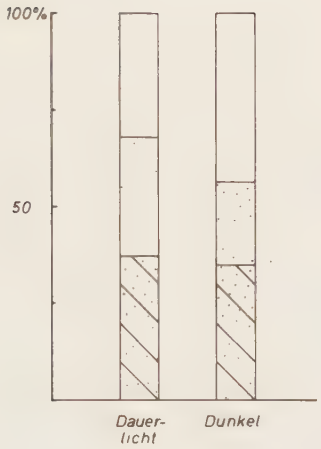


Abb. 10 Darstellung des löslichen Proteins (schräg schraffiert) und des Gesamtproteins (punktiert) als Anteile am Gesamtstickstoff (= 100 %) bei Sprossen 120 Std. alter Keimlinge nach Aufzucht im Dunkel bzw. Dauerlicht.

wurden an Sprossen 120 Std. alter etiolierter bzw. belichteter Keimlinge Gesamtstickstoff, Gesamtprotein und lösliches Protein bestimmt (Abb. 10). Die Dunkel- und Lichtsprosse unterscheiden sich in bezug auf den Gesamtstickstoff nicht (Dunkel: 0,369 mg N/Sproß; Licht: 0,359 mg N/Sproß); die allgemeine Entwicklungsgeschwindigkeit wird bei diesen Keimlingen also nicht vom Licht beeinflußt. Gesamtprotein und lösliches Protein wurden als prozentuale Anteile am Gesamtstickstoff aufgetragen. Auch an den Sprossen allein zeigt sich wiederum kein wesentlicher Unterschied in ihrem Gehalt an löslichem Protein. Dagegen findet sich in den belichteten Sprossen ca. 12 % mehr Gesamtprotein als in den etiolierten. Da die Menge an löslichem Protein nicht ernsthaft verändert ist, ergibt sich nur eine Erhöhung des unlöslichen Proteins um 38 % unter dem Einfluß des Dauerlichts. Sehr wahrschein-

lich dürfte es sich hierbei um chlorophylltragendes Strukturprotein der Chloroplasten handeln.

3. Charakterisierung der Wirkung des Lichts auf die Enzyme des Calvin-Zyklus als Einfluß über das Phytochromsystem

MARCUS 1960 konnte nachweisen, daß der Lichteinfluß auf die NADP-Triosephosphatdehydrogenase über das Phytochromsystem ausgeübt wird, was von MARGULIES 1965 bestätigt und ausgebaut wurde. Es entsteht die Frage, ob auch die anderen Fermente des Calvin-Zyklus einer Lichtkontrolle durch das HR-DR-System unterliegen; es gilt also, im folgenden den stimulierenden Einfluß des Lichts näher zu charakterisieren. Da die Photosyntheseenzyme sich nur in den Sproßorganen ausbilden, wurde der Vergleich der verschiedenen Lichteinflüsse an den Sprossen 120 Std. alter Keimlinge vorgenommen; in diesem Stadium befinden sich die Enzyme des Calvin-Zyklus bereits in guter Ausbildung, der Keimling ist aber noch nicht infolge Erschöpfung der Nährstoffe in Stickstoffmangel geraten.

a) Nachweis des HR-DR-Systems

Als Grundeffekt sei noch einmal an den Sprossen die durch Dauerweißlicht verursachte Steigerung der Aktivität der drei untersuchten Photosyntheseenzyme vorangestellt (Tab. III). Eine nähere Charakterisierung wird zunächst an der RuDPCO durchgeführt.

Tabelle III

Absolute Aktivitäten von Enzymen des Calvin-Zyklus in Sprossen 120 Std. alter Keimlinge nach Anzucht im Dunkel bzw. im Dauerlicht

Enzym	Dunkel	Dauerlicht	
RuDPCO	17,1±0,8	44,8±2,4	m/uM/Sproß x
Transketolase	87 ±2	137 ±8	" min
RPI	149 ±15	260 ±28	rel. Einh.

In orientierenden Versuchen hatte sich tatsächlich eine stimulierende Wirkung kurzfristiger HR-Bestrahlungen gezeigt. Als erstes sollte nun geprüft werden, ob während der Keimung

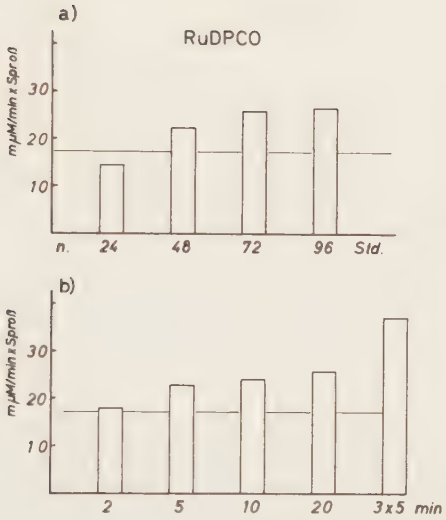


Abb. 11 Absolute Aktivität der Carboxydismutase in 120 Std. alten Sprossen nach Belichtung mit HR.

a) Je einmal 20 min HR in dem unter der Abszisse angegebenen Alter der Keimlinge.

b) Bestrahlung mit HR nach jeweils 72 Std. Keimung mit verschiedener Bestrahlungsdauer. 3 x 5 min HR wurden als je 5 min Belichtung nach 48, 72 u. 96 Std. geboten.

eine Phase besonderer Empfindlichkeit gegenüber der HR-Wirkung auftritt. Die Keimlinge wurden daher nach 24, 48, 72 bzw. 96 Std. je 20 min lang mit HR (661 mμ, ca. 900 erg pro cm^2 x sec) bestrahlt (Abb. 11 a). Es zeigt sich, daß die HR-Strahlung von einem Alter von 48 Std. an Einfluß auf die

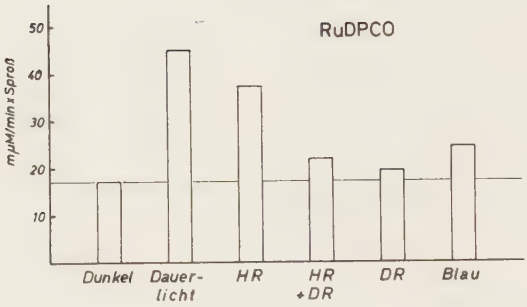


Abb. 12 Absolute Aktivitäten der Carboxydismutase in 120 Std. alten Sprossen, die dreimal je nach 48, 72 u. 96 Std. in der angegebenen Weise bestrahlt wurden (waagerechte Linie: Wert der Dunkelkontrollen).

Bildung der Carboxydismutase gewinnt; dann sind jedoch keine wesentlichen Unterschiede in der Empfindlichkeit zu beobachten. (Die Aktivitätssteigerung durch einen einzigen "HR-Stoß" ist nicht sehr groß; der Mittelwert für den HR-Stoß nach 72 Std., der mit dem t-Test geprüft wurde, erwies sich gegenüber den Dunkelkontrollen allerdings bereits als gesichert.)

Als nächstes war zu untersuchen, welche Bestrahlungsdauer minimal nötig bzw. sättigend ist. Die Keimlinge wurden jeweils im Alter von 72 Std. je 2, 5, 10 bzw. 20 min lang mit HR bestrahlt (Abb. 11 b). Eine Bestrahlungsdauer von 5 min ist offensichtlich bereits ausreichend für die volle Wirkung eines HR-Stoßes, und dieser ist damit bereits sättigend; denn durch Verlängerung der Bestrahlung bis auf 20 min läßt sich die Wirkung nicht mehr relevant steigern. Dagegen verursachen 15 min HR, als kurze Stöße von je 5 min Dauer in Abständen von je 24 Std. geboten, eine erheblich stärkere

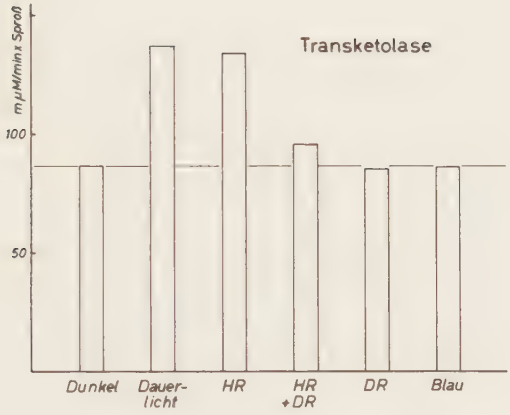


Abb. 13 Absolute Aktivitäten der Transketolase in 120 Std. alten Sprossen, die dreimal je nach 48, 72 u. 96 Std. in der angegebenen Weise bestrahlt wurden.

Steigerung der Aktivität. Die schnelle Sättigung der Reaktion mit recht geringen Energiemengen und die größere Effektivität intermittierend gebotenen Lichts gegenüber einmaliger Bestrahlung, wobei sich das Reizmengengesetz als nicht gültig erweist, sind bereits charakteristisch für das Phytochromsystem (vgl. MOHR 1959 a u. b, MOHR u. VAN NES 1963).

Zur eigentlichen Demonstration der Phytochromwirkung wurden die Keimlinge in der empfindlichen Phase zwischen 48 und 120 Std. dreimal in 24stündigem Abstand entsprechend bestrahlt: je nach 48, 72 und 96 Std. . Derartige dreimalige Bestrahlung mit je 5 min HR verdoppelt die Aktivität der RuDPCO und läßt nahezu den Dauerlichtwert erreichen (Abb. 12). Gleiche Quantenmengen Blau (435 mμ), ebenso geboten, erweisen sich als weit weniger wirksam. Werden direkt im Anschluß an die 5 min HR-Bestrahlung jeweils 15 min DR (726 mμ; ca. 1150 erg/cm^2 x sec) gegeben, so läßt sich die für das Phytochromsystem typische Reversibilisierung erreichen, d.h. der Einfluß des HR wird durch nachfolgendes DR nahezu auf-

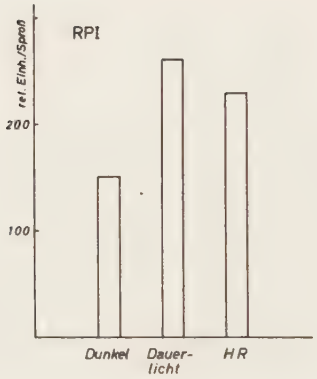


Abb. 14 Absolute Aktivität der RPI in Sprossen (nach 120 Std. Keimung), die im Dunkel oder Dauerlicht aufgezogen wurden bzw. nach 48, 72, 96 Std. mit je 5 min HR bestrahlt wurden.

gehoben. Durch je 15 min DR allein wird keine Steigerung der Aktivität bewirkt. Es scheinen damit genügend charakteristische Merkmale dafür aufgezeigt zu sein, daß die lichtabhängige Steigerung der Aktivität der RuDPCO unter der Vermittlung des HR-DR-Systems erfolgt (BORTHWICK et al.1954; MOHR 1957).

Wie aus der Abb. 13 ersichtlich, wird die lichtbedingte Förderung der Transketolase ganz analog der RuDPCO ebenfalls über das Phytochrom verursacht. Auch bei der RPI (Abb. 14) kommt die nach drei HR-Stößen von 5 min Dauer erreichte Aktivität dem Dauerlichtwert nahe; die Steigerung ihrer Aktivität durch das Licht dürfte daher ebenfalls über das HR-DR-System ausgelöst werden. Der strukturelle Zustand der Proplastiden wird durch die kurzen Bestrahlungen mit HR nicht wesentlich verändert (Abb. 8 b). Es scheinen höchstens Andeutungen beginnender Membranüberschiebungen an den Thylakoiden

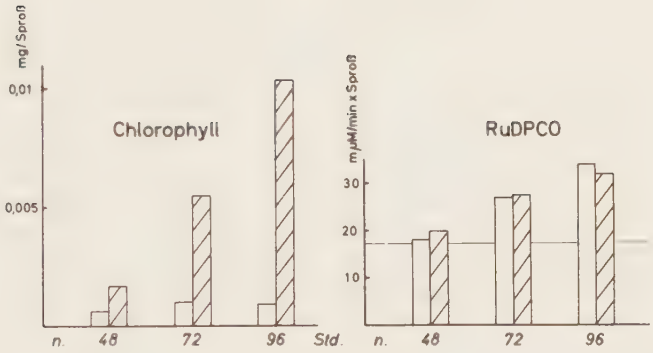


Abb. 15 Absolute Aktivität der RuDPCO bzw. der Chlorophyllgehalt von Sprossen (120 Std. alt), die je zu den angegebenen Zeiten einmal 12 Std. mit quantengleichem blauem (schräg schraffiert) bzw. dunkelrotem (weiße Säulen) Licht bestrahlt wurden.

erkennbar zu sein.

Nach den Untersuchungen von MARCUS 1960 über die NADP-Triosephosphatdehydrogenase konnte hiermit für drei weitere Enzyme des Calvin-Zyklus nachgewiesen werden, daß die Lichtkontrolle über das HR-DR-System erfolgt, ohne daß dabei eine meßbare Chlorophyllsynthese stattfindet. Damit ist es sehr wahrscheinlich, daß alle Enzyme des Calvin-Zyklus auf diese Weise vom Licht beeinflußt werden. Das Auftreten des Systems des Calvin-Zyklus findet aber, wie das Verhalten der Carboxydismutase in etiolierten Keimlingen anzeigt, unabhängig vom Licht statt und muß auf andere Weise während der Entwicklung der Keimlinge verursacht werden. Das Licht beschleunigt zwar die Zunahme der Aktivität z.B. der RuDPCO, induziert aber nicht ihr Auftreten überhaupt. Wenn das Auftreten der RuDPCO etwa indirekt über das Phytochrom induziert würde, dadurch das dieses auch ohne Lichtwirkung teils in der physiologisch

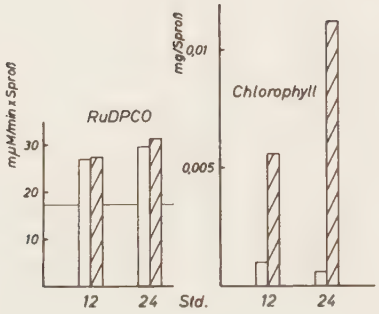


Abb. 16 Aktivität der RuDPCO bzw. Chlorophyllgehalt in Sprossen (im Alter von 120 Std.), die nach 72 Std. Keimung 12 bzw. 24 Std. mit Blau (schraffiert) bzw. DR (weiße Säulen) bestrahlt wurden.

wirksamen Form P_{DR} vorliegt (was nach BUTLER and LANE 1965 bei etiolierten Maiskeimlingen nicht der Fall ist), so müßte sich der Dunkelwert der Carboxydismutase durch DR unterdrücken lassen. Das aber ist weder nach kurzfristiger noch nach längerer Bestrahlung mit DR der Fall. (Vgl. Behandlung der Dunkelkeimer bei Lactuca durch MOHR u. APPUHN 1963)

b) Der Einfluß längerer Bestrahlung mit dunkelrotem oder blauem Licht

Die Effekte des HR-DR-Systems lassen sich gewöhnlich bei längeren Bestrahlungszeiten auch durch Licht aus dem dunkelroten bzw. blauen Spektralbereich erzielen. MARGULIES 1965 erhielt eine Erhöhung der Aktivität der NADP-Triosephosphatdehydrogenase auch nach langer Belichtung mit DR. Diese Möglichkeit bei den Photosyntheseenzymen zu untersuchen, ist deswegen besonders interessant, weil die Chlorophyllsynthese zwar im Blaulicht nicht aber im DR durchgeführt wird.

Der Einfluß des Lichts wurde zunächst wieder in verschiedenen Entwicklungsstadien geprüft. Die Keimlinge wurden jeweils nach 48, 72 bzw. 96 Std. je 12 Std. lang mit quantengleichem blauem (435 mμ; ca. 1500 erg/cm^2 x sec) bzw.

dunkelrotem Licht bestrahlt. Nach dieser langen Belichtung mit DR bzw. Blau ergibt sich - im Gegensatz zu dem Verhalten nach HR-Stößen - eine deutliche Abstufung der Empfindlichkeit (Abb. 15). Während das Licht nach 48 Std. noch keine signifikante Wirkung erzielt, nimmt diese mit fortschreitender Entwicklung zu. Ganz parallel damit nimmt auch die Fähigkeit zur Chlorophyllsynthese unter dem Einfluß von Blaulicht ab 48 Std. mit dem Entwicklungsalter zu, während im DR keine Chlorophyllbildung gemessen wurde. Dieser Unterschied der Sensibilität mag im einfachsten Falle daher rühren, daß fortschreitend mehr reagierendes Blattgewebe entsteht. Die Chlorophyllsynthese und damit anscheinend auch die vollständige Ausbildung des Photosyntheseapparats finden nur im Blaulicht statt; trotzdem weist die Aktivität der RuDrCO keine Unterschiede nach quantengleicher Blau- bzw. DR-Bestrahlung auf, d.h. auch bei dieser langfristigen und auf die Differenzierung der Chloroplasten unterschiedlich einwirkenden Belichtung erhält man keine Korrelation in der Bildung von Enzymen des Calvin-Zyklus und des Pigmentapparats.

Abb. 16 gibt ein Beispiel für die verschiedene zeitliche Abhängigkeit der Enzym- und Pigmentbildung von der Belichtung. Werden die Keimlinge nach 72 Std. Keimung 24 Std. belichtet, so ist auch die Menge des im Blaulicht gebildeten Chlorophylls gegenüber einer Bestrahlungszeit von 12 Std. etwa verdoppelt. Die Chlorophyllbildung steht also in direkter Abhängigkeit zur Belichtungszeit. Demgegenüber ist die weitere Aktivitätssteigerung der RuDrCO nur gering; nach 24 Std. Blau- bzw. DR-Bestrahlung erreicht die RuDrCO weniger Aktivität als nach drei getrennten HR-Stößen von 5 min Dauer.

4. Verlauf der Aktivität von Enzymen des Pentosephosphat-Zyklus während der Keimung

Die charakteristischen Enzyme des Pentosephosphat-Zyklus G-6-PDH (GIBBS 1952; ANDERSON et al. 1952) und 6-PGSDH (AXELROD and BANDURSKI 1952; BARNETT et al. 1953) sind mehrfach in Geweben höherer Pflanzen, Weizenkeimen, Blättern und Wurzeln, nachgewiesen worden und zeigen dort weite Verbreitung. An 48 Std. alten Keimlingen von Phaseolus radiatus

konnten CHAKRAVORTY u. BURMA 1959 das Vorhandensein sämtlicher Enzyme des Pentosephosphat-Zyklus feststellen. Bei ihren orientierenden Versuchen, welches das geeignetste Stadium für den Nachweis der Reaktionen des Pentosephosphat-Zyklus sei, stellten sie außerdem fest, daß G-6-PDH und 6-PGSDH nach 48 Std. Keimung in ihrer Aktivität rasch abfallen. Da sie ganze Keimlinge verwandten, könnte dieses Verhalten weitgehend von den Kotyledonen bestimmt worden sein. (Außerdem stellten sie ihre Extrakte durch Homogenisieren im Waring Blendor her, wodurch die Enzymaktivität stark beeinträchtigt sein könnte; vgl. Methodik) Im übrigen gilt nach MAYER und POLJAKOFF-MAYBER 1963: "Evidence for the existence of the pentose phosphate cycle in seeds is extremely scant."

a) Verhalten der Aktivitäten der G-6-PDH, 6-PGSDH und DSSR in etiolierten Keimlingen und nach Anzucht im Dauerlicht

Das Verhalten der ebenfalls zum Pentosephosphat-Zyklus gehörigen Fermente RPI und Transketolase wurde bereits im Rahmen der Enzyme des Calvin-Zyklus behandelt. Hier sollen jetzt die für den Pentosephosphat-Zyklus spezifischen Enzyme G-6-PDH und 6-PGSDH betrachtet werden. Außerdem wird hier die 5-Dehydroshikimisäurereduktase angeschlossen; denn die Synthese der Shikimisäure bezieht einen Vorläufer, Erythrose-4-Phosphat, aus dem Pentosephosphat-Zyklus - oder dem Calvin-Zyklus - . Außerdem wird die DSSR bei den späteren Versuchen ein geeignetes Vergleichsenzym abgeben.

Zwischenferment und 6-PGSDH sind in den Embryonen trockener Samen bereits vorhanden und nehmen während der Keimung zu. Das Zwischenferment zeigt dann jedoch ein gegenüber allen bisher betrachteten Enzymen ungewöhnliches Verhalten: nach 96 Std. ist keine weitere nennenswerte Zunahme der Aktivität mehr zu beobachten (Abb. 17), obgleich die Reservestoffe in diesem Stadium noch nicht verbraucht sind und die Proteinsynthese noch nicht zum Stillstand gekommen ist (vgl. Abb. 9). Dementsprechend sinkt die spezifische Aktivität, die bis 48 Std. sehr stark ansteigt, dann beträchtlich ab. Bei der 6-PGSDH erfolgt kein so abrupter Abbruch der Aktivitäts-

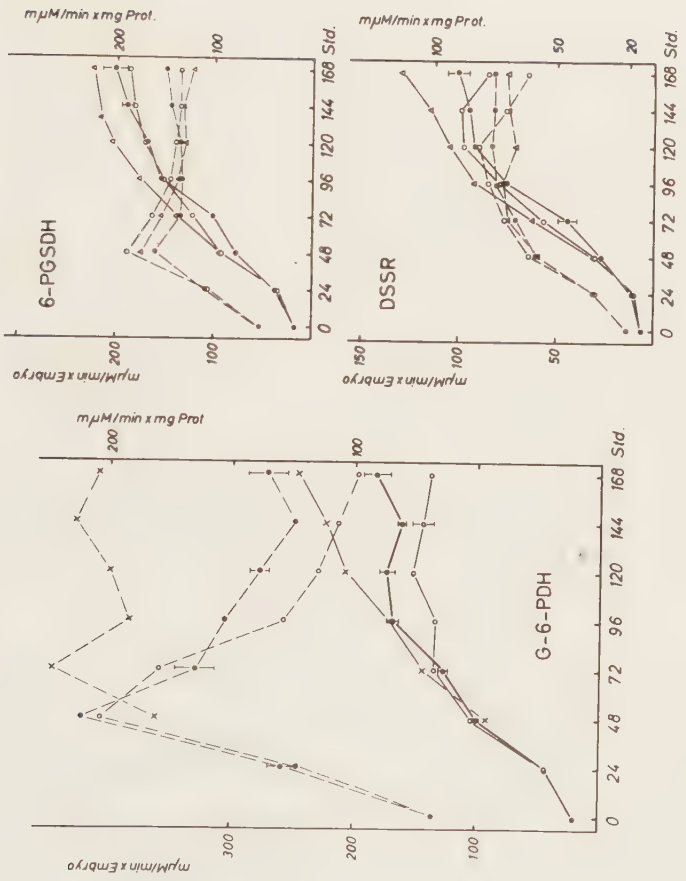


Abb. 17 Änderungen der absoluten (durchgezogene Linien) bzw. spez. Aktivitäten (unterbrochene Linien) der G-6-PDH, 6-PGSDH, DSSR im Embryo während der Keimung.

- ● Anzucht auf H_2O im Dunkeln
- ○ Anzucht auf H_2O im Dauerlicht
- △ Anzucht auf Nährlösung im Dauerlicht
- X Anzucht mit Chloramphenicol (1,5 mg/ml)

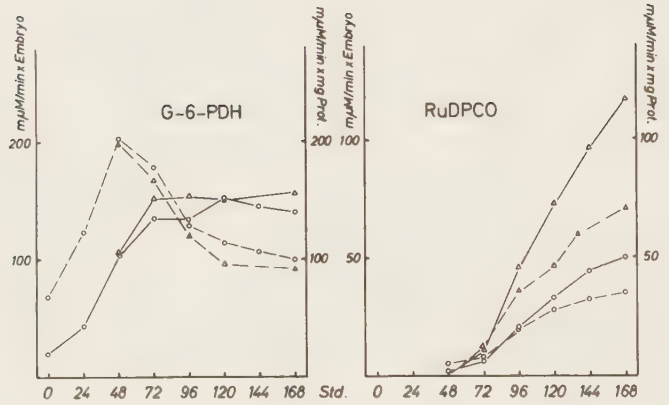


Abb. 18 Verlauf der absoluten (durchgezogene Kurven) und spezifischen Aktivität (unterbrochene Kurven) der RuDPCO und G-6-PDH nach Anzucht im Dauerlicht

o auf H_2O

Δ auf Knop'scher Nährlösung

zunahme, sondern ihre Bildungsrate schwächt sich allmählich ab (Abb. 17); auch das Absinken der spezifischen Aktivität ist daher weniger ausgeprägt. Während bis 96 Std. die Aktivität der G-6-PDH höher liegt als die der 6-PGSDH, wird sie dann von der 6-PGSDH überflügelt.

Wenn die Keimlinge im Dauerlicht aufgezogen werden, stimmt der Verlauf der Aktivität der 6-PGSDH völlig mit dem etiolierter Keimlinge überein. Das Verhalten des Zwischenferments wird durch das Licht zwar auch nicht wesentlich modifiziert, jedoch findet im Licht schon nach 72 Std. keine weitere Zunahme der Aktivität mehr statt, wenngleich dieser Unterschied für sich allein nicht sehr beträchtlich ist. Das Absinken der spezifischen Aktivität wird entsprechend markanter.

DSSR wird in geringer Aktivität ebenfalls schon in den Embryonen trockener Samen gemessen. Der Anstieg ihrer Aktivität folgt dann einer Wachstumskurve und wird durch das Licht

nicht beeinflußt (Abb. 17). In Bezug auf das Protein nimmt sie anfangs erheblich stärker zu und folgt dann eng dem Anstieg des Proteins, d.h. ihre spezifische Aktivität pendelt sich in einem konstanten Bereich ein.

b) Enzyme des Pentosephosphat- und des Calvin-Zyklus bei Anzucht der Keimlinge auf Nährlösung im Dauerlicht

Das ungewöhnlich frühe Aufhören einer weiteren Aktivitätszunahme des Zwischenferments wirft die Frage nach seiner Ursache auf. Die Reservestoffe sind zwar noch nicht verbraucht, aber das Zwischenferment könnte aufgrund noch nicht übersehbarer Eigenschaften (z.B. Geschwindigkeit oder Substratbedürfnisse seiner Bildung) auf rein ernährungsphysiologische Weise in der Konkurrenz der Enzymsynthesen speziell benachteiligt sein; daher könnte das Stehenbleiben der Aktivität des Zwischenferments doch ein Symptom eines sich selektiv besonders frühzeitig auswirkenden Stickstoffmangels sein. Um einen möglichen Stickstoffmangel auszuschalten, wurden die Keimlinge in Bedingungen gebracht, in denen die Proteinsynthese auf jeden Fall nicht zum Stillstand kommt: sie wurden im Dauerlicht (Erzeugung von Kohlenhydrat) auf Knop'scher Nährlösung angezogen.

Unter diesen Bedingungen wird mehr Protein gebildet, und seine Synthese klingt noch nicht nach 120 Std. ab (Abb. 9). In bezug auf die Enzyme fällt das Ergebnis bemerkenswert eindeutig aus. Die Aktivität der Photosyntheseenzyme RuDPCO (Abb. 18) und Transketolase (Abb. 6) steigt gegenüber den H_2O-Kontrollen mehrfach schneller an. Auch 6-PGSDH und DSSR (Abb. 17) nehmen entsprechend der vermehrten Proteinsynthese stärker zu, d.h. ihre spezifischen Aktivitäten bleiben dabei doch im gleichen Bereich wie ohne Nährlösung. In schroffem Gegensatz zu dem Verhalten aller anderen Enzyme nimmt die Aktivität des Zwischenferments auch unter diesen Bedingungen, durch die ein Stickstoffmangel ausgeschaltet sein dürfte, nach 72 Std. nicht weiter zu,und die spezifische Aktivität fällt entsprechend drastisch ab (Abb. 18). Das Verhalten der G-6-PDH läßt sich daher nicht als einfache Stickstoffmangelerscheinung ansehen, sondern muß durch eine andersartige

spezifische Regulation verursacht werden. Bemerkenswert ist zugleich, daß nur das Zwischenferment dieses außergewöhnliche Verhalten zeigt, nicht aber die zu demselben Zyklus gehörige 6-PGSDH.

5. Über Beziehungen zwischen dem Verhalten des Zwischenferments und der Enzyme des Calvin-Zyklus (RuDPCO)

Auf der Suche nach der möglichen Bedeutung, die einer Unterdrückung der Aktivitätszunahme der G-6-PDH zukommen mag, ergibt sich ein weiterführender Vergleich mit dem Verlauf der Carboxydismutase, also einem spezifischen Schlüsselenzym des Calvin-Zyklus. Es zeigt sich, daß der Anstieg der Aktivität des Zwischenferments gerade immer dann abbricht, wenn die RuDPCO zum ersten Male meßbar ist: in etiolierten Keimlingen nach 96 Std., im Dauerlicht entsprechend 24 Std. eher.

Calvin-Zyklus und Pentosephosphat-Zyklus haben eine Reihe von Reaktionen gemeinsam. Sie führen teils auch zu den gleichen Intermediärprodukten nur mit dem Unterschied, daß der Reaktionsweg, der zu diesen Produkten führt, einmal von der Carboxydismutase oder im anderen Falle vom Zwischenferment eingeleitet wird. Falls eine Aufgabe dieser Zyklen darin läge, derartige Zwischenprodukte zu liefern, die in beiden erzeugt werden können, würde die Vermutung nahegelegt, daß neben einem aktiv funktionierenden photosynthetischen Calvin-Zyklus ein stärker ausgebildeter Pentosephosphat-Zyklus eigentlich überflüssig ist; denn die entsprechenden Produkte könnten auch aus dem Photosynthesesystem abgezweigt werden, vorausgesetzt, daß keine Barrieren (z.B. Plastidenmembranen) im Wege stehen und nicht stärkere Konkurrenz durch andere Stoffwechselprozesse diese Produkte unzugänglich macht. Damit könnte der beobachteten Erscheinung ein hypothetischer Sinn untergelegt werden, daß das Zwischenferment gerade immer dann zum Stillstand kommt, wenn in der Entwicklung die RuDPCO und damit wohl das ganze Enzymsystem des Calvin-Zyklus auftritt, obgleich es in den etiolierten Keimlingen noch gar nicht zu seiner normalen Funktion befähigt ist. In Verfolgung dieses Gedankens entsteht die Frage, ob diese soweit nur formale Korrelation auch einen kausalen Hintergrund hat: ob das

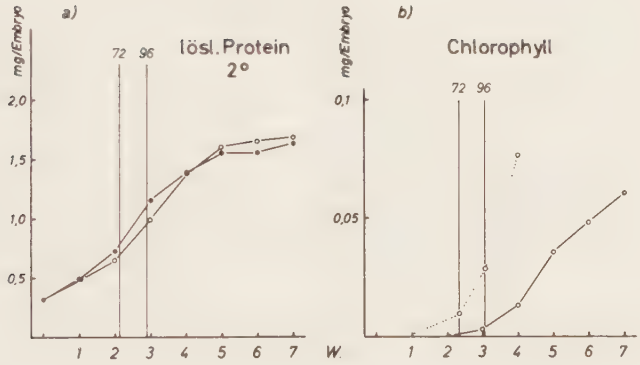


Abb. 19 a) Pufferlösliches Protein, b) Gesamtchlorophyll der Embryonen nach Anzucht bei 2°. Gepunktete Kurve in b) gibt den Chlorophyllgehalt von Embryonen gleichen Proteingehalts nach Anzucht bei 22° wieder.

● Anzucht im Dunkeln

○ Anzucht im Dauerlicht

Zwischenferment zu einem weiteren Anstieg seiner Aktivität zu veranlassen ist, wenn es gelänge, die Photosyntheseenzyme selektiv zu unterdrücken. Es haben sich tatsächlich hierfür geeignete Bedingungen finden lassen: das Wachstum bei tiefer Temperatur und die Einwirkung von Chloramphenicol, einem Hemmstoff der Proteinsynthese.

a) Hemmung des Photosyntheseapparats durch Anzucht bei tiefer Temperatur

In diesen Versuchen wurden die Keimlinge 24 Std. bei 22° angekeimt und dann in eine Temperatur von ca. 2° umgesetzt, wo die weitere Entwicklung stattfand. Es wurden wöchentlich Proben genommen. Die Angaben über die Zeit des Aufenthalts bei 2° schließen immer ein, daß 24 Std. Keimung bei 22° vorausgingen. Nach 7 Wochen Wachstum bei 2° hatten die Keimlinge den ohne Nährstoffzufuhr etwa maximalen Entwicklungszustand

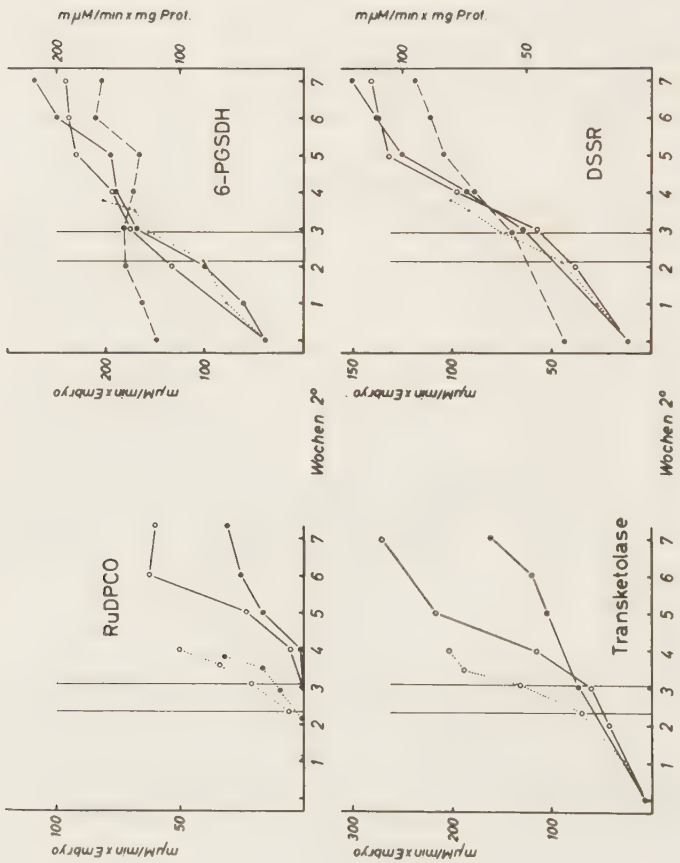


Abb. 20 Absolute (durchgezogene Linien) bzw. spez. Aktivitäten (unterbrochene Linien) von Enzymen in Embryonen nach Wachstum bei 2°. Die gepunkteten Kurven geben die absolute Aktivität entsprechender Keimlinge gleichen Proteingehalts bei 22° an.

- ● Aufzucht im Dunkeln
- o Aufzucht im Dauerlicht

erreicht. Ein Vergleich sich derart verschieden schnell entwickelnder Pflanzen erscheint schwierig und muß von einer gemeinsamen Vergleichsbasis ausgehen, die eine unter beiden Bedingungen leicht zugängliche, repräsentative und entwicklungsabhängige Größe darstellen muß. Als Vergleichsbasis wurde daher der ohnehin aus jedem getesteten Extrakt bestimmte Gehalt an löslichem Protein gewählt; Stadien bei 22° bzw. bei 2° werden also in bezug auf ihren Entwicklungszustand als gleichartig betrachtet, wenn sie gleich viel Protein enthalten. Der genaue Vergleich läßt sich praktisch, wie folgt, ausführen: in der Kurve des Proteins bei 22° (Abb. 9) wird für ein Keimungsstadium, 24, 48, 72 usw. Std., der zugehörige Proteingehalt ermittelt und dieser auf der Darstellung des Proteins bei 2° (Abb. 19) wieder aufgesucht. Damit ergibt sich auf der Abszisse, die Wochen bei 2° darstellt, das dem zu vergleichenden Wert von 22° entsprechende Stadium nach Anzucht bei tiefer Temperatur. So entspricht etwa ein Keimling von 72 Std. bei 22° einem solchen von ca. 2,1 Wochen bei 2° (Aufzucht im Dunkeln). Nach diesem Prinzip sind in den Darstellungen der Enzymaktivitäten die besonders interessanten Stadien von 72 und 96 Std. markiert und Vergleichswerte der Entwicklung bei 22° in die Aufzeichnungen des Aktivitätsverlaufs bei 2° übertragen. Die Keimlinge bilden bei der tiefen Temperatur maximal etwas mehr lösliches Protein als bei 22° (Abb. 19).

Wie aus der Darstellung der Abb. 20 ersichtlich, tritt bei der tiefen Temperatur die Carboxydismutase im Dunkel wie im Licht erst nach 4 Wochen zum ersten Mal meßbar auf. Das entspricht einem Entwicklungsstadium, bei dem sie bei 22° längst beträchtliche Aktivität aufwies. Der Anstieg der Transketolaseaktivität ist in der Kälte ebenfalls vergleichsweise unterdrückt (Abb. 20); auch das Chlorophyll tritt, wenn zugleich Licht gegeben wird, in der Entwicklung stark verzögert auf (Abb. 19), wenngleich es der RuDPCO noch voraneilt. Es ergibt sich insgesamt das Bild, daß offenbar das Auftreten des gesamten Photosyntheseapparats durch die tiefe Temperatur in der Entwicklung der Keimlinge stark hinaus-

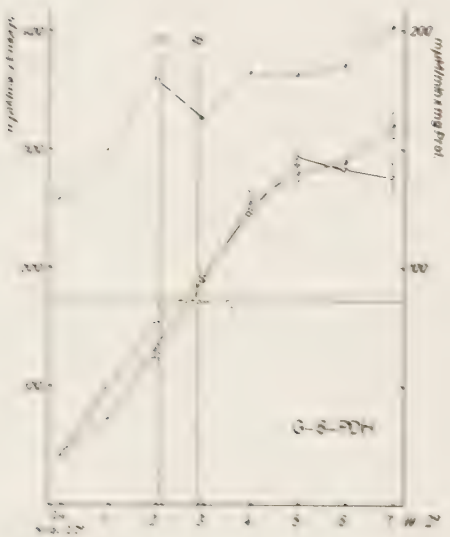


Abb. 2: Aktivität der G-6-PDH in Embryonen nach Aufzucht bei 25°. Ausgezogene Kurven: Absolute Aktivität; unterbrochene: spez. Aktivität; gepunktete: absolute Aktivität der Embryonen gleichen Proteingehalts bei 25°.

● nach Anzucht im Dunkeln

○ nach Anzucht im Dauerlicht

Dieser Effekt kann auch durch die Einwirkung von Dauerlicht während des Wachstums in der Kälte nicht aufgehoben werden. Das Licht erhöht zwar die Aktivität der Dehydrierungsenzyme erheblich, vermag aber das Auftreten der Isoenzymbanden nicht wesentlich zu verschieben. Der Eingriff der Temperatur dürfte daher kausal noch vor dem Einfluß des

Lichts auf die Ausbildung der Enzyme des Calvin-Zyklus stehen.

Mit der geschilderten Unterdrückung der Enzyme des Calvin-Zyklus ist tatsächlich auch ein weiterer Anstieg der Aktivität des Zwischenferments verbunden (Abb. 21). Nach 7 Wochen Aufenthalt der Keimlinge bei 2° wird die bei 22° erreichte Aktivität der G-6-PDH fast um 100 % übertroffen. Die spezifische Aktivität sinkt unter diesen Bedingungen daher auch nicht ab, sondern bleibt ab 2 Wochen im wesentlichen konstant oder nimmt schwach zu. Sie bleibt in dem Bereich, der bei normaler Temperatur nach 48 Std. erreicht war. Gemäß der Tatsache, daß das Licht nicht in der Lage war, das Erscheinen der RuDPCO in der Kälte vorzuverlegen, übt es auch auf den Verlauf der Aktivität der G-6-PDH bei 2° keinen wirklich modifizierenden Einfluß aus. Nur die nach 7 Wochen vorhandene maximale Aktivität scheint ein wenig geringer als bei den zugehörigen Dunkelkeimlingen zu sein. Nach 7 Wochen steigt die Aktivität nicht mehr an, aber es findet auch keine Proteinsynthese mehr statt. Ebenso läßt sich die Abnahme der Zuwachsrate des Zwischenferments nach 4 - 5 Wochen nicht allein mit der Bildung der Carboxydismutase korrelieren; denn die Proteinsynthese erlahmt in dieser Zeit auch bereits.

6-PGSDH und auch DSSR erzielen nach 7 Wochen bei 2° (Abb. 20) zwar ebenfalls eine etwas höhere Aktivität als nach 168 Std. bei normaler Temperatur. Aber dieser Zuwachs scheint sich gänzlich darauf zurückführen zu lassen, daß auch entsprechend mehr Protein gebildet wird; denn die erreichten spezifischen Aktivitäten liegen etwa in der Größenordnung wie nach Aufzucht bei 22 °. Das Verhalten dieser beiden Enzyme wird durch die tiefe Temperatur somit nicht grundsätzlich beeinflußt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Versuche bei tiefer Temperatur die Annahme bestätigen, daß zwischen dem Auftreten des Enzymapparats des Calvin-Zyklus und dem Abbruch der Bildung des Zwischenferments ein ursächlicher Zusammenhang zu bestehen scheint. Der Einfluß der Kälte verzögert das Auftreten des Photosyntheseapparats während der

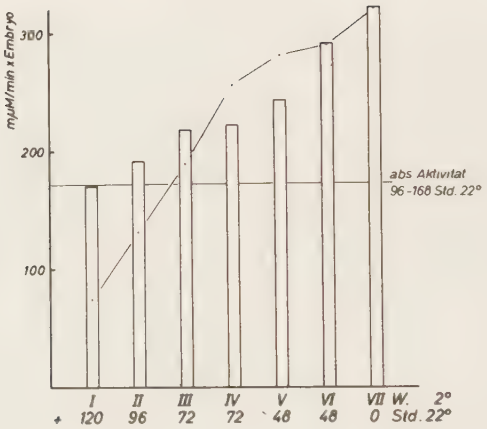


Abb. 22 Säulen: Aktivität der G-6-PDH in Keimlingen, die bei 2^{o} im Dunkeln aufgezogen wurden (in der oberen Zeile unter der Abszisse angegebene Zeit in Wochen) und dann nach Umsetzen bei 22^{o} bis zu maximaler Entwicklung weiterwuchsen (untere Zeile unter der Abszisse). Kurve: Zum Zeitpunkt der Umsetzung bei 2^{o} erreichte Aktivität.

Entwicklung und führt zugleich - im Gegensatz zu den Verhältnissen bei 22^{o} - zu einer Fortsetzung der Aktivitätszunahme des Zwischenferments.

b) Umsetzungsversuche zur Charakterisierung des Temperatureinflusses auf die Aktivität der G-6-PDH und zur Prüfung der Abhängigkeit der Kältewirkung vom Entwicklungsstadium der Keimlinge

In der ersten Versuchsgruppe wurden die Keimlinge nach einem bestimmten Aufenthalt in der Kälte wieder in normale Temperatur zurückgesetzt; in der zweiten Versuchsgruppe wurden sie nicht wie üblich nach 24 Std., sondern nach verschieden langer Keimung bei 22^{o} in die tiefe Temperatur umgesetzt. Die Keimlinge blieben bei der Temperatur, in die sie umgesetzt

worden waren, noch eine genügend lange Zeit, daß sie sich etwa maximal entwickeln konnten; sie hatten dann einen Gehalt von 1,4 - 1,6 mg löslichen Proteins erreicht. Da die Aktivität des Zwischenferments in den ganzen Embryonen ein maximales Niveau erreicht, das dann etwa gleich bleibt, wurde die Aktivität der G-6-PDH jeweils nach vollständiger Entwicklung der Keimlinge gemessen; das ermöglicht dann einen Vergleich der erreichten Aktivitätsniveaus.

Umsetzungen von 2^{o} in 22^{o}

Wie die Abb. 22 zeigt, übt die tiefe Temperatur ihre fördernde Wirkung auf den Anstieg der Aktivität der G-6-PDH nur aus, solange sie tatsächlich einwirkt, d.h. im allgemeinen hinterläßt sie keine Nachwirkung auf die weitere Entwicklung bei 22^{o}. Eine Woche tiefe Temperatur hat gar keinen Einfluß; die nach 4 und 5 Wochen bei 2^{o} erreichte Aktivität wird bei anschließendem Aufenthalt bei 22^{o} eher wieder reduziert. Wenn die Keimlinge allerdings nach 2 oder 3 Wochen Wachstum bei 2^{o} wieder in normale Temperatur gebracht werden, steigt die zum Zeitpunkt der Umsetzung erreichte Aktivität weiter an; sie überschreitet aber auch das normalerweise zwischen 96 und 168 Std. bei 22^{o} erreichbare mittlere Niveau der Aktivität des Zwischenferments, obgleich dieses bei 2^{o} erst nach ca. 3 Wochen erreicht wird. In diesem Falle wirkt sich also auch bei 22^{o} noch eine geringe durch den Kälteeinfluß bedingte Förderung des Zwischenferments aus. Dazu ist ein Vergleich mit dem Aktivitätsverlauf der RuDPCO bei 2^{o} aufschlußreich (Abb. 20). Nach 2 bis 3 Wochen bei 2^{o} ist das System des Calvin-Zyklus, des hypothetischen Gegenspielers des Zwischenferments, noch durch die tiefe Temperatur unterdrückt; bis zu seiner Aktivierung hat daher die G-6-PDH auch nach der Umsetzung noch Gelegenheit, in seiner Aktivität weiter anzusteigen.

Umsetzungen von 22^{o} in 2^{o}

Wenn die Keimlinge in verschiedenem Alter aus der normalen Temperatur in die tiefe Temperatur übertragen werden, so zeigt sich, daß der Einfluß der Kälte nicht grundsätzlich, sondern nur bis zu einem bestimmten Entwicklungsstadium ein Ansteigen

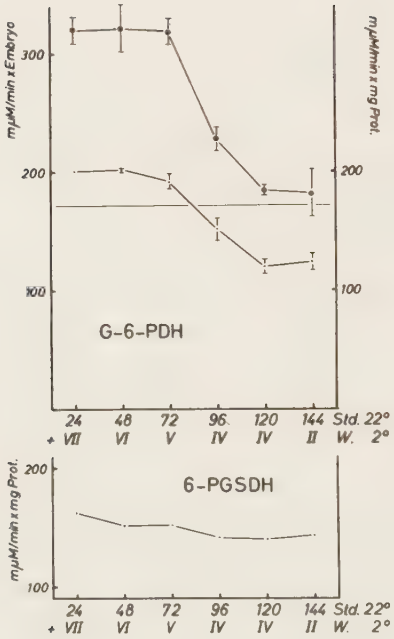


Abb. 23 Aktivität der G-6-PDH bzw. der 6-PGSDH in etiolierten Keimlingen, die nach verschieden langer Entwicklung bei 22° (obere Zeile unter der Abszisse) in 2° umgesetzt wurden und dort bis zu maximaler Entwicklung weiterwuchsen (untere Zeile unter der Abszisse).

—●— absolute Aktivität

—•— spez. Aktivität

der Aktivität des Zwischenferments veranlassen kann. Werden die Keimlinge bis 72 Std. in 2° gebracht, so können sie die gleiche hohe Aktivität an G-6-PDH erlangen wie bei Übertragung nach 24 Std. (Abb. 23). In der Zeit zwischen 72 und 96 Std. sinkt die durch Umsetzen in die Kälte erreichbare Aktivität plötzlich sehr stark ab; schließlich vermag die tiefe Tempe-

ratur keinen deutlichen Einfluß auf die Aktivität der G-6-PDH mehr auszuüben. Die spezifischen Aktivitäten entsprechen in ihrem Verhalten dem Gang der absoluten Aktivitäten. Das plötzliche Absinken der fördernden Wirkung der Kälte auf das Zwischenferment zwischen 72 und 96 Std. zeigt wiederum eine auffällige Parallelität zum Verhalten der Carboxydismutase; denn sie tritt bei 22° gerade zwischen 72 und 96 Std. zuerst auf.

Zum Vergleich ist auch die spezifische Aktivität der 6-PGSDH aus demselben Versuch dargestellt (Abb. 23). Nach frühem Umsetzen in die tiefe Temperatur wird eine geringfügig höhere spezifische Aktivität ausgebildet; im übrigen teilt die 6-PGSDH aber gar nicht das beim Zwischenferment beobachtete markante Verhalten. Sie dürfte daher nicht von der auf das Zwischenferment ausgeübten Regulation betroffen sein.

c) Vergleichende Untersuchungen über das Verhalten der G-6-PDH und RuDPCO bei Sommerroggen

Die bisher geschilderten Versuche wurden an Winterroggen ausgeführt. Die tiefe Temperatur übt auf diese Keimlinge zugleich die physiologische Wirkung aus, daß sie die Pflanzen in einen blühbereiten Zustand versetzt. Es besteht daher die Möglichkeit, daß die Förderung der G-6-PDH mit der Herstellung der Blühbereitschaft infolge der sogen. Vernalisation in Zusammenhang steht. In diesem Fall wäre aber zu fordern, daß beim Sommerroggen das Zwischenferment auch bei normaler Temperatur einen glatten Anstieg seiner Aktivität aufweist und die Kälte keinen wesentlichen Einfluß hat; denn beim Sommerroggen ist zum Blühen keine Kältebehandlung erforderlich.

Die Abb. 24 faßt die Verhältnisse beim Sommerroggen kurz zusammen. Der Verlauf der Aktivität des Zwischenferments knickt beim Sommerroggen zwar nicht in so scharfer Form ab wie beim Winterroggen, aber seine Zuwachsrate verlangsamt sich ganz erheblich. Analog zum Winterroggen findet sich bei der spezifischen Aktivität auch ein Maximum nach 48 Std., dem ein starker Abfall folgt. Auch hier tritt RuDPCO in den etiolierten Keimlingen auf, zuerst ebenfalls nach 96 Std..
Sechs Wochen Wachstum der Sommerroggenkeimlinge bei 2°

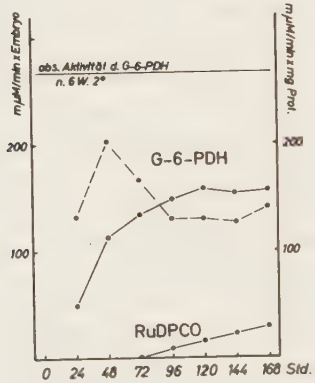


Abb. 24 Verlauf der Aktivität der G-6-PDH und RuDPCO in Keimlingen von S o m m e r r o g g e n nach Anzucht bei 22° im Dunkeln und absolute Aktivität der G-6-PDH nach 6 Wochen Wachstum bei 2°.

———— absolute Aktivität

— — — spezifische Aktivität

bringen sie auf eine weit höhere Aktivität an G-6-PDH. Die Verhältnisse beim Sommerroggen bestätigen also grundsätzlich die am Winterroggen gewonnenen Befunde und geben ihnen eine allgemeinere Bedeutung; wegen dieses gleichartigen Verhaltens der beobachteten Effekte bei Sommer- und Winterroggen dürften sie in keinem direkten Zusammenhang mit dem Geschehen bei der Vernalisation stehen.

d) Vergleich von Wurzel und Sproß bezüglich des Verhaltens der G-6-PDH

Carboxydismutase tritt nur im Sproß auf. Da es daher fraglich ist, ob das am Gesamtembryo beschriebene gegensinnige Verhalten von RuDPCO- und G-6-PDH-Anstieg nur im Sproß stattfindet oder auch die Wurzel betrifft, soll das Verhalten der G-6-PDH in Wurzel und Sproß einmal gesondert betrachtet werden.

Tabelle IV

Vergleich des Einflusses tiefer Temperatur auf die Aktivität der G-6-PDH in den Wurzeln und im Sproß

Wurzel			Sproß	
72 Std. 22°	144 Std. 22°	7 W. 2°	168 Std. 22°	7 W. 2°
34,5	50,1	54,0	116	201
243±35	232±15	262±25	131±3,2	157±6,1

obere Zeile: m/uM/Organ; untere Zeile: m/uM/mg Protein

Beim Sproß nimmt nach 96 Std. die Zuwachsrate des Zwischenferments deutlich ab, und entsprechend sinkt die spezifische Aktivität (Abb. 26). Allerdings knickt die Aktivitätskurve allmählich und nicht so scharf ab wie beim gesamten Embryo. Nach 7 Wochen Wachstum bei 2° enthält ein Sproß absolut fast die doppelte Aktivität an G-6-PDH gegenüber den Kontrollen aus normaler Temperatur. Allerdings ist bei der Aufzucht in der tiefen Temperatur auch der Gehalt eines Sprosses an löslichem Protein ganz beträchtlich erhöht, so daß die bei 2° erreichte spezifische Aktivität nicht in gleichem Maße die von normalen Sprossen übertrifft (Tab. IV).

In der Wurzel nimmt die Aktivität des Zwischenferments zwischen 72 und 144 Std. zu, und auch die spezifische Aktivität bleibt auf gleicher Höhe. Nach 7 Wochen Entwicklung bei 2° weisen die Wurzeln etwa die gleiche Aktivität auf wie nach 144 Std. bei 22°. Die spezifische Aktivität liegt ebenfalls im gleichen Bereich wie bei 22°, wenn man die größere Schwankungsbreite bei der Wurzel berücksichtigt. Es läßt sich daher wohl sagen, daß der Zuwachs an Aktivität des Zwischenferments durch den Einfluß tiefer Temperatur allein dem Sproß zuzuschreiben ist (Tab. IV). Eine Beeinflussung der Zwischenfermentsbildung durch Bedingungen, die sich beim Auftreten der RuDPCO ergeben, dürfte sich daher nur im Sproß abspielen.

Ein Vergleich des Aktivitätsverlaufs der G-6-PDH im Sproß (Abb. 26) und im Gesamtembryo (Abb. 17) lehrt allerdings, daß das am Gesamtembryo beobachtete plötzliche Stehenbleiben der absoluten Aktivität eine Überlagerungserscheinung sein dürfte; sie ergibt sich daraus, daß sich im Sproß die Aktivitätszunahme verlangsamt und gleichzeitig die Aktivität des Zwischenferments im Scutellum abnimmt. Beim Sommerroggen lag die Koordinierung dieser verschiedenen Prozesse offenbar etwas anders, so daß dort auch am Gesamtembryo das Abknicken der Aktivitätskurve nicht dermaßen scharf erfolgte.

e) Hemmung der Enzyme des Calvin-Zyklus durch Chloramphenicol

Ein Hemmstoff der Proteinsynthese, Chloramphenicol, lieferte eine zweite Möglichkeit, die Enzyme des Calvin-Zyklus sehr wirkungsvoll und zugleich selektiv zu unterdrücken. Eine Hemmung der Aktivitätszunahme der RuDPCO bei Belichtung durch Chloramphenicol berichtet auch MARGULIES 1964. Er findet zugleich, daß verschiedene Enzyme unterschiedlich stark beeinflußt werden; so wird die NADP-Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase nicht gehemmt. Nach MOLOTSKOVSKY u. MORIAKOVA 1963 ist mit der Hemmung des Proteins eine Unterdrückung des Chlorophylls durch Chloramphenicol verbunden. Mit dem Hemmstoff besprühte Keimlinge von Vicia faba sollen erst nach 6 - 7 Tagen Belichtung leicht ergrünen.

Die Schalen für die Anzucht der Keimlinge wurden bei diesen Versuchen mit einer entsprechenden Lösung von Chloramphenicol in dest. Wasser beschickt. Wie ein orientierender Versuch an ganzen Keimlingen mit relativ hoher Konzentration (1,5 mg/ml) ergab, ließ sich durch diese Behandlung ein geringer weiterer Anstieg der G-6-PDH erzielen (Abb. 17). Der Effekt ließ sich aber deutlicher darstellen, wenn bei diesen Versuchen nur das Verhalten der Sprosse untersucht wurde.

Wenn die Keimlinge auf einer Chloramphenicollösung (1 mg/ml) angezogen werden, ist der Gehalt ihrer Sprosse an löslichem Protein durchschnittlich nicht mehr als 20 % geringer als bei den Kontrollen (Abb. 25). Eine genau entsprechende Hemmung weist auch die DSSR auf; daher zeigt die Lage ihrer spezifi-

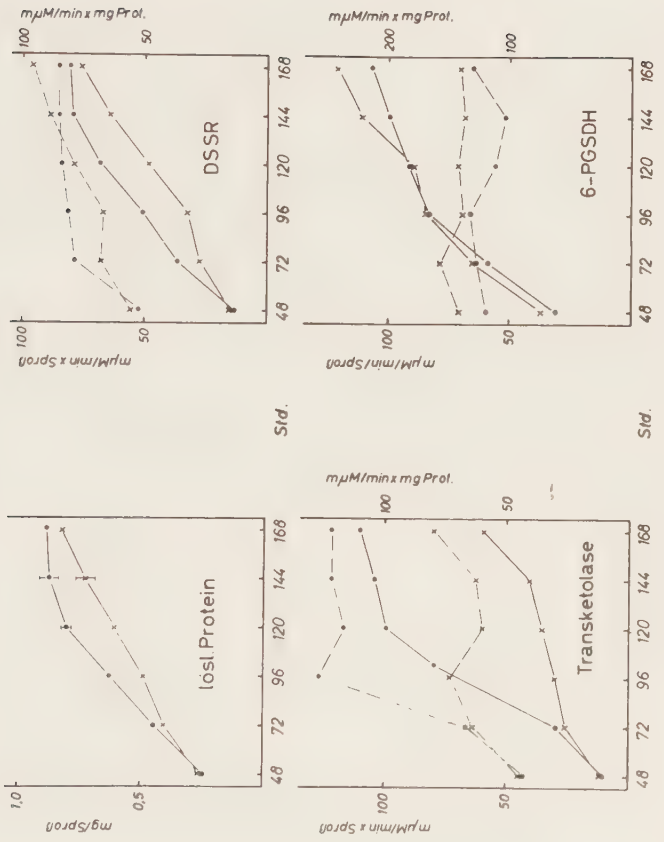


Abb. 25 Proteingehalt und absolute (durchgezogene Linien) bzw. spez. Aktivitäten (unterbrochene Linien) von Enzymen in Sprossen nach Aufzucht bei 22° im Dunkeln.

● auf H_2O

× auf Chloramphenicol (1 mg/ml)

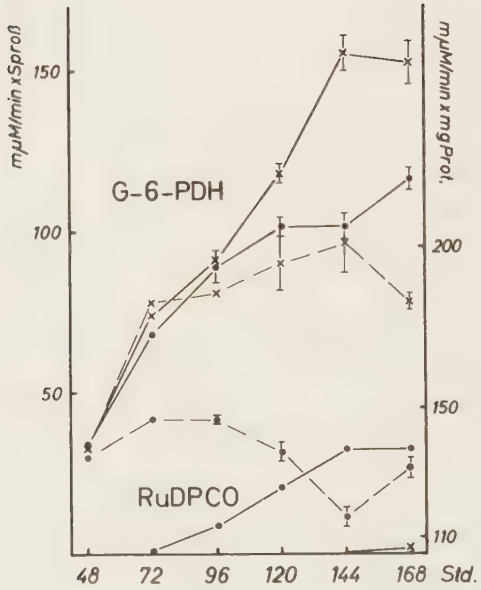


Abb. 26 Absolute (durchgezogene Linien) und spezifische Aktivität (unterbrochene Linien) der G-6-PDH und RuDPCO in Sprossen nach Anzucht bei 22° im Dunkeln

● auf H_2O

× auf Chloramphenicol (1 mg/ml)

schen Aktivität keine wesentlichen Unterschiede zwischen normalen und mit Hemmstoff behandelten Keimlingen. Im Gegensatz hierzu werden die getesteten Enzyme des Calvin-Zyklus und das Zwischenferment nicht in der gleichen Weise beeinflußt wie das Protein. Die Carboxydismutase wird durch Chloramphenicol komplett gehemmt; sie ist nach 168 Std. nur in Spuren nachweisbar (Abb. 26). Die Aktivität der Transketolase ist ebenfalls auf weniger als die Hälfte der normalen Werte herabgedrückt (Abb. 25). (Diese "Restaktivität" dürfte hauptsäch-

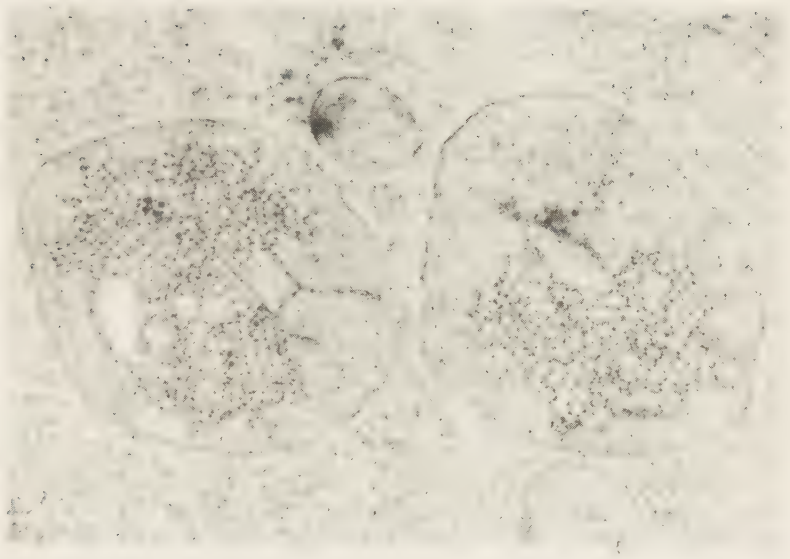


Abb. 27 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Proplastiden aus dem Blättchen eines 120 Std. alten Keimlings nach Anzucht bei 22° im Dunkeln mit Chloramphenicol (1 mg/ml). Fixierung: Glutaraldehyd + OsO_4; Vergrößerung: 35500fach.

lich auf die dem System des Pentosephosphat-Zyklus angehörende plasmatische Transketolase zurückgehen.) Dagegen wird der Verlauf der Aktivität von 6-PGSDH durch den Hemmstoff kaum beeinflußt. Bei der G-6-PDH zeigt sich nun der bemerkenswerte Effekt, daß ihre Aktivität nicht gehemmt wird, sondern bei der Einwirkung von Chloramphenicol steigt sie im Gegensatz zu dem Verhalten nach normaler Anzucht auch nach 96 Std. bis 144 Std. linear weiter an (Abb. 26). Danach ließ sich keine weitere Zunahme mehr beobachten, aber die Keimlinge dürften auch allgemein bereits stärker geschädigt sein. Die spezifische Aktivität des Zwischenferments liegt dementsprechend weit höher als nach normaler Anzucht.

Durch die Versuche mit Chloramphenicol ließ sich das bereits durch die tiefe Temperatur erzielte Phänomen bestätigen, daß die Aktivität des Zwischenferments glatt weiter ansteigt, wenn das Auftreten der RuDPCO, die repräsentativ für den Calvin-Zyklus steht, unterdrückt wird. Das bekräftigt aber den Schluß, daß zwischen der plötzlichen Unterdrückung der Aktivitätszunahme des Zwischenferments und dem Auftreten der Fermente des Calvin-Zyklus ein ursächlicher Zusammenhang zu bestehen scheint.

Unklar ist, wie es zu dieser unterschiedlichen Einwirkung des Chloramphenicols auf die verschiedenen Enzyme kommt, vor allem zu der drastischen Hemmung der untersuchten Photosyntheseenzyme. In diesem Zusammenhang sind elektronenmikroskopische Aufnahmen der Proplastiden aus den Blättchen mit Chloramphenicol behandelter etiolierter Keimlinge aufschlußreich (Abb. 27). Sie sind viel kleiner als entsprechende normale Proplastiden (Abb. 7). Ihr Stromaanteil ist sehr gering, und sie weisen keine oder nur Andeutungen von Thylakoiden auf. Dagegen ist ihr Prolamellarkörper aber mindestens ebenso ausgebildet wie in normalen Proplastiden und nimmt daher fast den ganzen Raum der klein gebliebenen Plastiden ein. Wenn man die strukturelle Ausbildung der Proplastiden nach normaler Anzucht und nach Behandlung mit Chloramphenicol und ihre enzymatische Ausstattung vergleicht, wird also der Schluß nahegelegt, daß die Enzyme des Calvin-Zyklus nicht im Prolamellarkörper lokalisiert sein können, sondern in dem Protein des Stromas oder der Thylakoide enthalten sein müssen.

f) Zusammenfassender Vergleich der Einflüsse von tiefer Temperatur, Chloramphenicol und Licht auf die Aktivität des Zwischenferments

Tab. V gibt Versuche wieder, in denen tiefe Temperatur, Chloramphenicol und Licht in verschiedenen Kombinationen auf die Entwicklung der Keimlinge einwirkten. An Sprossen, die zumindest nahezu das Maximum ihrer Entwicklungsfähigkeit erreicht haben, sind die Aktivitäten der Enzyme G-6-PDH, RuDPCO und DSSR und der Proteingehalt dargestellt.

Tabelle V

Die Einflüsse von Temperatur, Chloramphenicol und Licht auf die Aktivität der Enzyme G-6-PDH, RuDPCO, DSSR und den Proteingehalt in Sprossen, die etwa das jeweils mögliche Maximum ihrer Entwicklung erreicht haben. Konzentration des Chloramphenicols (ChlA): bei 22° 1 mg/ml, bei 2° 0,5 mg/ml.

	144 Std. 22° Dunkel		7 Wochen 2°		9 Wochen 2°	
Enzym	H$_2$O	ChlA	Dunkel	Licht	ChlA(Dunkel)	ChlA(Licht)
G-6-PDH (mμM/min x Sproß)	101±3,7	155±5,7	201± ,3	191±3,5	251±10,1	212±8,3
G-6-PDH (mμM/min x mg Prot.)	11 ±3,6	20 1±9,1	157±6,1	142±3,3	253±17,5	224±18,9
RuDPCO (mμM/min x Sproß)	32,5	0,0	25,5±3,3	62,1±5,8	0,5	10,8±2,3
DSSR (mμM/min x mg Prot.)	85,5	89,5	104	98,5	100,6	103
Protein (mg/Sproß)	0,875	0,727	1,26	1,352	0,99	0,962

Die DSSR dient als neutrales Vergleichsenzym, das unter den verschiedenen Bedingungen weder eine bevorzugte Förderung noch eine Hemmung erfährt, sondern sich immer etwa ebenso wie das Protein verhält. Daher zeigt ihre spezifische Aktivität keine wesentlichen Veränderungen. Es sei betont, daß alle drei aufgeführten Enzyme jeweils an denselben Extrakten getestet wurden.

RuDPCO wird in etiolierten Keimlingen bei 2^{o} durch Chloramphenicol ebenso vollständig unterdrückt wie bei 22^{o}. Aber auch in den Sprossen von Keimlingen, denen bei 2^{o} neben Chloramphenicol zugleich Dauerlicht geboten wurde, ist ihre Aktivität noch geringer als nach Anzucht auf Wasser in etiolierten Keimlingen. Die durch die tiefe Temperatur bewirkte Verzögerung der Bildung von Carboxydismutase ist an den dargestellten Endstadien nicht mehr ablesbar.

Beachtenswert ist vor allem das Verhalten der G-6-PDH unter den verschiedenen Einflüssen. Ihre Aktivität kann durch die Behandlung mit Chloramphenicol bei 22^{o} nicht so weit erhöht werden, wie es durch die tiefe Temperatur möglich ist. Wenn aber neben der tiefen Temperatur noch Chloramphenicol geboten wird, so läßt sich die durch die Kälte bewirkte Steigerung der Aktivität noch signifikant erhöhen. Die von der tiefen Temperatur ausgeübte Hemmung der Carboxydismutase - wenn man diese wieder hypothetisch als Voraussetzung einer weiteren Erhöhung des Zwischenferments betrachtet, - wird also durch das Chloramphenicol noch vervollständigt. Aber die Einflüsse von Chloramphenicol und Kälte könnten an verschiedener Stelle in die Bildung der Enzyme des Calvin-Zyklus eingreifen; es könnten sich so auch unabhängig voneinander erzielte Effekte summieren. Da die Aktivitätssteigerung der G-6-PDH durch Chloramphenicol immer mit einer Unterdrückung des Proteins verbunden ist, wird ihre spezifische Aktivität durch den Hemmstoff sehr drastisch erhöht.

Das Licht vermag den Zeitpunkt des Auftretens von Carboxydismutase bei tiefer Temperatur nicht vorzuverlegen. Allerdings wird der Anstieg der Aktivität der RuDPCO auch in der Kälte durch Licht beschleunigt. Dementsprechend liegt die

Aktivität des Zwischenferments in Sprossen nach Aufzucht bei 2^{o} im Licht zwar knapp unter der entsprechenden Dunkelkontrolle, jedoch bleibt der Unterschied nur vernachlässigenswert gering. Schon eher prägt sich ein geringer Unterschied zwischen Licht- und Dunkelanzucht bei den Keimlingen aus, die bei der tiefen Temperatur auch noch Chloramphenicol erhalten hatten.

g) Vergleich der Wirkungen verschiedener Hemmstoffe der Proteinsynthese

Eine Reihe weiterer Hemmstoffe der Protein- bzw. RNS-Synthese wurde daraufhin untersucht, ob sich mit ihnen eine ähnliche Beeinflussung der Aktivität von G-6-PDH und RuDPCO erzielen läßt wie durch Chloramphenicol. Geprüft wurden: Actinomycin D, welches die DNS-abhängige RNS-Synthese blokkiert; 2-Thiouracil, als Antimetabolit des Uracils ein Hemmstoff der RNS-Synthese; p-Fluorophenylalanin, ein Analogon des Phenylalanins (Tab. VI). Die Konzentrationen sind so ausprobiert worden, daß eine deutliche Hemmung des Proteins bzw. der RuDPCO bewirkt wird und die Keimlinge dabei nicht zu stark geschädigt werden. Bei den Versuchen wurden die Sprosse 144 Std. alter etiolierter Keimlinge getestet; denn nach Abb. 26 sind in diesem Stadium die Unterschiede am größten.

Die Carboxydismutase wird zwar von allen Inhibitoren stärker gehemmt als das entsprechende gesamte lösliche Protein, aber die Hemmung ist in allen Fällen weder so vollständig noch so selektiv wie nach der Einwirkung von Chloramphenicol. Dementsprechend wird durch die geprüften anderen Hemmstoffe auch keine vergleichbare absolute Erhöhung der Aktivität des Zwischenferments ausgelöst. Die spezifische Aktivität des Zwischenferments ist nur nach Behandlung mit Actinomycin D deutlich größer. Thiouracil hemmt auch die G-6-PDH. Nach 96 Std. beträgt die Aktivität der Sprosse bei den Kontrollen 89 m/µM, bei den mit Thiouracil behandelten Keimlingen 76 m/µM/min x Sproß; die entsprechenden spezifischen Aktivitäten sind 142 bzw. 141 m/µM/min x mg Protein. Daraus ist ersichtlich, daß das Zwischenferment in gleichem Maße gehemmt

Tabelle VI

Vergleich der Wirkung verschiedener Hemmstoffe der RNS- bzw. Proteinsynthese auf die Aktivität verschiedener Enzyme in Sprossen 144 Std. alter Keimlinge nach Anzucht bei 22° im Dunkeln: Chloramphenicol (ChlA), Actinomycin D (Act.), 2-Thiouracil (TU), p-Fluorophenylalanin (p-FPhe).

Enzym	H_2O	ChlA (1 mg/ml)	Act. (0,1mg/ml)	TU ($4x10^{-4}$M)	p-FPhe ($6x10^{-3}$M)
G-6-PDH (mμM/min x Sproß)	102±3,7	155±5,7	120±2,8	99±6,3	111±4,0
G-6-PDH (mμM/min x mg Prot.)	116±3,6	201±9,1	162±4,4	123±7,0	134±4,4
RuDPCO (mμM/min x Sproß)	32,5	0,0	23,6	11,1	10,3
DSSR (mμM/min x mg Prot.)	85,5	89,5	96,0	73,6	66,5
% Verminderung des Proteins		17 %	12 %	13 %	5 %

wurde wie das Bezugsprotein. Allerdings ist das Auftreten der RuDPCO noch stärker gehemmt; daher nimmt die Aktivität der G-6-PDH bei Behandlung mit Thiouracil auch nach 96 Std. noch weiter zu, während sie bei den Kontrollen zu stagnieren beginnt, und erreicht so trotz der Hemmung durch das Gift nach 144 Std. wieder den Wert der Kontrollen.

Die Aktivität der 6-PGSDH wird durch keinen der aufgeführten Hemmstoffe stärker beeinflußt. Als Vergleichsenzym ist wieder die DSSR aufgeführt. Auch an diesem Enzym ist eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber den verschiedenen Hemmstoffen ablesbar.

Die Tatsache, daß sich die Aktivität des Zwischenferments nur durch den Hemmstoff Chloramphenicol signifikant steigern läßt, der auch die RuDPCO nahezu vollständig unterdrückt, liefert eine weitere Stütze für die Annahme, daß ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Enzyme des Calvin-Zyklus und der Unterdrückung der G-6-PDH besteht.

Diskussion

Im Endosperm bietet sich ein übersichtliches Beispiel für verschiedenartige Differenzierungen von Geweben im Bereich der Enzyme. Die Enzyme der Glykolyse und des Pentosephosphat-Zyklus finden sich ziemlich ausschließlich in den Aleuronzellen, während andere Fermente auch im Stärkeendosperm vorkommen. Nach ROBERTS 1964 ist auch die Cytochromoxydase vorwiegend in den Aleuronzellen lokalisiert. Dementsprechend ist auch nur die Aleuronschicht zur Atmung und zum Aminosäureeinbau befähigt (VARNER u. CHANDRA 1964), und sie allein vermag die Leistungen des Endosperms während der Keimung durchzuführen, z.B. die Synthese von α-Amylase (BRIGGS 1964). Neben der Atmung über Cytochromoxydase findet in den Aleuronzellen wegen der ungewöhnlich hohen Aktivität der ADH wahrscheinlich eine starke alkoholische Gärung statt. Der Pentosephosphat-Zyklus ist auch in den Aleuronzellen nicht funktionsfähig; es ist nur die Kette der Reaktionen bis zur RPI vorhanden, die R-5-P als letztes Produkt liefert, das für die RNS-Synthese gebraucht werden dürfte. Die Stoffwechselmöglichkeiten des Stärkeendosperms sind noch weit extremer begrenzt. Da eine Atmung hier nicht stattfinden kann, mögen die im Stärkeendosperm vorgefundenen Enzyme des TCC und des Aminosäurestoffwechsels nur der Gewinnung der C-Skelette von Aminosäuren und dem Umbau von Intermediärprodukten beim Abbau von Kohlenhydrat und Protein dienen, falls ihnen überhaupt eine Bedeutung zukommt.

Auch der Vergleich der spezifischen Enzymaktivitäten der Organe eines Embryos zeigt, daß die Organe in ihrer Enzymausstattung eine eigentümliche Differenzierung aufweisen, die bestimmte Vorzugsrichtungen und spezielle Aufgaben des Stoffwechsels erkennen läßt. Der Sproß ist natürlich als Sitz der Enzyme der Photosynthese ausgezeichnet. Die relativ hohe Aktivität der DSSR deutet an, daß ihm auch eine besondere Rolle bei der Synthese aromatischer Verbindungen zufallen kann. Das Scutellum ist dem Endosperm darin ähnlich, daß es eine hohe Aktivität an ADH besitzt und Amylasen produziert.

Es besitzt aber auch Enzyme des Pentosephosphat-Zyklus - im Gegensatz zum Endosperm einschließlich der Transketolase - in hoher Aktivität. Mit Enzymen des TCC und des Aminosäurestoffwechsels ist das Scutellum ebenfalls relativ gut ausgestattet; auch die enzymatische Ausstattung macht also deutlich, daß das Scutellum zu Beginn der Keimung einen Ort hoher Stoffwechsel- und Syntheseaktivität darstellt.

GANGULI 1955 schließt aus seinen Untersuchungen an Bohnenkeimlingen und deren Organen, daß die Wurzel Hauptort einer verstärkten Bildung freier Aminosäuren ist. Die beobachtete besonders hohe Aktivität der GlDH und auch der Transaminasen unterstreicht ebenfalls, daß der Wurzel eine wesentliche Rolle bei der Assimilation von NH_3-Stickstoff über die Bildung von Aminosäuren zukommt. Zur Lieferung der nötigen C-Skelette ist offenbar ein leistungsfähiger TCC vorhanden, der von einer entsprechenden Glykolyse gespeist werden kann. Das in Aminosäuren assimilierte NH_3 kann zum Zwecke der Speicherung und zum Transport aber teilweise noch in andere Verbindungen übertragen werden; denn die Wurzel kann zu recht komplexen Leistungen befähigt sein (vgl. MOTHES u. ENGELBRECHT 1956). Außerdem dürfte sich die Bedeutung der Wurzel vorwiegend auf die Lieferung solcher Aminosäuren beschränken, die aus dem TCC-Pool stammen; daneben gibt es andere wichtige Produktionsstätten für Aminosäuren. So werden aus dem Photosynthesepool stammende Aminosäuren wie Serin und Glycin aus den Blättern von Sojabohnen in den Stamm geleitet (CLAUSS, MORTIMER, GORHAM 1964). Ein Enzym der Serinsynthese, die Alanin-Hydroxypyruvat-Transaminase, findet sich dementsprechend nach WILLIS u. SALLACH 1963 in grünen Blättern in hoher Aktivität, während sie in Samen und Wurzeln nur in sehr geringer Menge nachzuweisen ist.

Enzyme aus den wichtigsten Wegen des Grundstoffwechsels wurden schon in den Embryonen der trockenen Samen gefunden. Die für den Start der Keimung benötigte enzymatische Ausrüstung für den Betrieb des Grundstoffwechsels dürfte daher beim Roggen bereits in den trockenen Samen bereitliegen. Den begrenzenden Faktor, der die lag-Phase der Protein-

synthese zu Beginn der Keimung bedingt, sehen auch MARCUS u. FEELEY 1964 bei Weizenkeimen und Erdnußkotyledonen nicht in dem Fehlen von bestimmten Enzymen, sondern in der Bildung von m-RNS. Nur in Spuren oder nicht vorhanden waren in den Embryonen trockener Samen nur Enzyme, die ihre eigentliche Bedeutung wohl auch erst später während der Entwicklung erlangen: GlDH und Photosyntheseenzyme, RuDPCO, RPI, Transketolase. Hiervon zeigt allerdings nur RuDPCO spezifisch das Auftreten des Calvin-Zyklus an; denn RPI und Transketolase sind auch am Pentosephosphat-Zyklus beteiligt.

Durch Belichtung ließ sich nur die Aktivität der behandelten Enzyme des Calvin-Zyklus erhöhen. Es ließen sich eine Reihe von Kennzeichen dafür aufweisen, daß der steuernde Einfluß des Lichts über das Phytochromsystem vermittelt wird:

1) Gegenüber dunkelrotem und blauem Licht bevorzugte Wirksamkeit geringer Energiemengen an HR bei der Steigerung der Aktivität
2) Reversibilisierung des HR-Effekts durch DR
3) Sättigung eines HR-Stoßes schon nach sehr kurzer Bestrahlungsdauer
4) In Abständen gebotene kurze HR-Stöße sind weit wirksamer als die Summe der Bestrahlungszeiten, einmal geboten.

Nach der NADP-Triosephosphat-Dehydrogenase (an Bohnen) ist hiermit für drei weitere am Calvin-Zyklus beteiligte Enzyme eine Kontrolle über das HR-DR-System nachgewiesen. Damit ist zugleich wahrscheinlich, daß das gesamte Enzymsystem des Calvin-Zyklus unabhängig von einer Chlorophyllsynthese über das Phytochromsystem beeinflußt werden kann. Eine gemeinsame Kontrolle wäre um so leichter vorstellbar, wenn die Enzyme in einem Multienzymkomplex zusammenhängen, wie von SIMON, DORRER, TREBST 1964 für Chlorella postuliert wird. Dem Licht kann aber nicht die primäre Rolle der Genaktivierung zukommen, wie von MOHR u. LANGE 1965 für die Anthocyansynthese aufgrund der Hemmbarkeit durch Actinomycin D angenommen wird; denn die RuDPCO tritt völlig unabhängig vom Licht schon bei Keimung im Dunkeln auf. Diese Dunkelaktivität

läßt sich auch nicht durch DR unterdrücken; sie kann daher nicht dadurch ausgelöst sein, daß das Phytochrom auch im Dunkeln teilweise als P_{DR} vorliegt. Außerdem wird bei tiefer Temperatur trotz Belichtung das Auftreten der Carboxydismutase verzögert; die in der Kälte wirkenden Faktoren greifen also kausal noch vor dem Licht in die Kontrolle der Aktivität der Carboxydismutase ein.

Die Erhöhung der Aktivität der Photosyntheseenzyme durch das Licht könnte auf einer allgemeinen Beschleunigung der Plastidenentwicklung und der in ihnen stattfindenden Proteinsynthese beruhen. Daraus könnte auch die von HENSHALL u. GOODWIN 1964 an Erbsenkeimlingen beobachtete Stimulierung der Aminosäure-aktivierenden Enzyme resultieren; denn nach HEBER 1962 sind 15 - 40 % aller Aminosäure-aktivierenden Enzyme der Zelle beim Spinat in den Chloroplasten enthalten.

Als aufschlußreich erwiesen sich auch elektronenmikroskopische Aufnahmen der Proplastiden. Sie zeigen, daß die Ausbildung der Enzyme des Calvin-Zyklus in dem strukturellen Zustand der Proplastiden eine Parallele findet. Auch bei Dunkelkeimlingen werden bereits Thylakoide ausgebildet, aber ohne daß sich diese dabei nach Art der Grana assoziieren. Durch Chloramphenicol, das die Photosyntheseenzyme so bevorzugt hemmt, werden ebenfalls der Stromabereich und die Thylakoide der Proplastiden entsprechend stark unterdrückt, während bemerkenswerterweise der Prolamellarkörper unbeeinflußt bleibt.

Mit dem Auftreten der Carboxydismutase, die dabei aber nur repräsentativ für das Enzymsystem des Calvin-Zyklus oder die Entwicklung der Chloroplasten stehen dürfte, ließ sich der Verlauf der Aktivität des Zwischenferments korrelieren, des Eingangsenzyms des Pentosephosphat-Zyklus. Es ließ sich eine Reihe von Argumenten dafür beibringen, daß ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Carboxydismutase und einer Unterdrückung des Zwischenferments besteht:

1) In der Normalentwicklung wird die Zunahme der Aktivität der G-6-PDH immer dann unterdrückt, wenn RuDPCO auftritt, im Licht entsprechend 24 Std. eher als im Dunkeln.

2) Die Verminderung der Bildung von Zwischenferment kann nicht durch Nährstoffmangel verursacht sein, sondern es muß eine spezifische Hemmung allein auf das Zwischenferment ausgeübt werden; andere nicht an der Photosynthese beteiligte Enzyme sind nicht betroffen, nicht einmal die 6-PGSDH.
3) Unter Bedingungen, durch die die Bildung der RuDPCO selektiv unterdrückt oder hinausgezögert wird, z.B. durch Wachstum bei tiefer Temperatur oder Behandlung mit Chloramphenicol, nimmt die Aktivität des Zwischenferments unbehindert linear zu. Eine Erhöhung der Aktivität des Zwischenferments wird aber nur erreicht, wenn z.B. die Kälte vor dem Auftreten der RuDPCO einwirken kann.
4) Andere Hemmstoffe der RNS- und Proteinsynthese, die keine so komplette und selektive Hemmung der RuDPCO bewirken wie das Chloramphenicol, lassen auch die Aktivität des Zwischenferments nicht über sein normales Niveau ansteigen.

Eine Erhöhung der Aktivität des Zwischenferments läßt sich also gerade immer dann erreichen, wenn es gelingt, das Auftreten der RuDPCO zu unterdrücken. Das legt die Schlußfolgerung nahe, daß im Zuge oder als Folge des Auftretens des Enzymsystems des Calvin-Zyklus eine spezifische Hemmung ausgeübt wird, die eine weitere Bildung von Zwischenferment unterdrückt.

Ungewiß ist, wie es zu der beobachteten bevorzugten Hemmung von Enzymen des Calvin-Zyklus durch Kälte bzw. Chloramphenicol kommt, die wahrscheinlich den weiteren Anstieg der G-6-PDH unter diesen Bedingungen ermöglicht. Die tiefe Temperatur kann ihre Wirkung offenbar recht schnell und direkt ausüben; denn sie gewährleistet einen weiteren Anstieg des Zwischenferments auch noch, wenn die Keimlinge unmittelbar vor dessen Hemmung, nach 72 Std., der Kälte ausgesetzt werden. Zum andern wird das durch tiefe Temperatur bedingte Ansteigen des Zwischenferments gewöhnlich sogleich abgebrochen, sobald die Keimlinge wieder in normale Temperatur zurückgebracht werden. Der Einfluß der Kälte auf das Zwischenferment und

damit wahrscheinlich auch zunächst auf Enzyme des Calvin-Zyklus scheint also nicht eine sekundäre Folge weitläufiger anderer durch die Kälte bedingter Reaktionen oder Umstellungen im Stoffwechselsystem der Keimlinge zu sein, über deren Vermittlung die Kälte erst einen indirekten Einfluß auf die Bildung der fraglichen Enzyme erhielte. Wenn ein solcher durch tiefe Temperatur bedingter Zustand einmal hergestellt wäre, müßte er auch noch bei normaler Temperatur weiterwirken können, d.h. nach einer Kältebehandlung von ausreichender Dauer sollte das Zwischenferment auch bei normaler Temperatur weiter ansteigen.

Eine unterschiedliche Hemmung verschiedener Enzyme durch Chloramphenicol bei Bohnen berichtet auch MARGULIES 1964. Bemerkenswert ist, daß auch bei E. coli nur induzierte Enzymsynthesen durch Chloramphenicol bevorzugt unterdrückt werden, was durch eine Anhäufung von Repressoren erklärt wird (SYPHERD, STRAUSS, TREFFERS 1962, PAIGEN 1963); auch hier bleibt z.B. die Aktivität der G-6-PDH unbeeinflußt. Im Falle der höheren Pflanzen wäre auch denkbar, daß das System der Proteinsynthese in den Proplastiden dem Hemmstoff gegenüber empfindlicher ist als im Cytoplasma. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen auch, daß die Ausbildung der Proplastiden durch Chloramphenicol sehr stark beeinträchtigt wird.

Für den biologischen Sinn einer Regulation, durch die beim Auftreten des Calvin-Zyklus der Pentosephosphat-Zyklus an seinem Eingangsenzym unterdrückt wird, soll im folgenden ein Deutungsversuch vorgeschlagen werden. Gerade in Phasen starken Wachstums benötigte Intermediärprodukte wie R-5-P (Nukleinsäuren, Pentosane der Zellwand, Cofaktoren) oder E-4-P (aromatische Aminosäuren, Lignin, Anthocyan) lassen sich sowohl aus dem Calvin- als auch aus dem Pentosephosphat-Zyklus ableiten; neben einer laufenden und produktionsfähigen Photosynthese kann daher in dieser Hinsicht ein zusätzlicher Pentosephosphat-Zyklus als nicht unbedingt notwendig angesehen werden - es dürfte ihm allerdings auch eine Rolle bei der Lieferung von reduziertem NADP für Synthesen im cytoplasmatischen Bereich zukommen -. Dabei wären aber zwei Voraus-

setzungen zu erfüllen, deren Nachweis noch erst zu erbringen ist: a) Die entsprechenden pools müssen kommunizieren; denn die Chloroplastenmembran ist nicht für alle Metabolite durchlässig (vgl. HEBER u. WILLENBRINK 1964). b) Die entsprechenden Produkte müssen sich in beliebigem oder doch ausreichendem Maße aus dem Ablauf der Photosynthese abziehen lassen.

Unter diesem Gesichtspunkt ist der Pentosephosphat-Zyklus vorwiegend in heterotrophen Ernährungszuständen unentbehrlich als ein "Ersatz" der Photosynthese zur Lieferung der fraglichen Zwischenprodukte und könnte in autotrophen Phasen wieder reduziert werden. Eine derartige Deutung wird bestärkt durch Befunde von HUTH 1965, daß die Aktivität der G-6-PDH bei Chlorella bei heterotropher Kultur beträchtlich zunimmt, während sie bei der obligat autotrophen Chlamydomonas eugametos nur äußerst gering ist. Die Befähigung einer Pflanze zu heterotrophem Wachstum erfordert offenbar nicht nur das Vorhandensein einer C_6-Kohlenhydratquelle, sondern auch eine spezifische Ausrüstung auf der Ebene der Enzyme, z.B. die Fermente des Pentosephosphat-Zyklus.

Eines der allgemeinsten Kennzeichen der Keimung ist, daß sie eine Phase heterotrophen Wachstums darstellt. Dementsprechend werden zu ihrem Beginn auch Enzyme des Pentosephosphat-Zyklus hergestellt. Die in den Keimlingen herrschenden Bedingungen lösen dann auch unabhängig vom Einfluß des Lichts die Bildung von Enzymen des Calvin-Zyklus aus, obgleich diese in etiolierten Keimlingen noch gar nicht ihre normale Funktion ausüben können. Damit aber tritt eine Hemmung auf, wodurch das Eingangsenzym des Pentosephosphat-Zyklus, das Zwischenferment, unterdrückt wird. Somit wird zumindest bei den Roggenkeimlingen von der enzymatischen Situation her der Übergang zur Autotrophie obligat erforderlich. Unter dem Einfluß von tiefer Temperatur wird offenbar die Fähigkeit zu heterotrophem Wachstum verlängert.

Offen und eine zukünftige Aufgabe bleibt die Frage nach dem Mechanismus der aufgezeigten Regulation. Ebenso ist noch ungeklärt, ob das beobachtete Regulationssystem eine Eigenheit der untersuchten Keimlinge ist oder bei höheren Pflanzen weitere Verbreitung zeigt.

Zusammenfassung

1) An Keimlingen von Winterroggen wurden die Aktivitäten verschiedener Enzyme der Glykolyse (Aldolase, ADH, LDH), des TCC (ICDH, MDH; PEPCO), des Aminosäurestoffwechsels (GlDH, GPT, GOT), des Pentosephosphat-Zyklus (G-6-PDH, 6-PGSDH) und des Calvin-Zyklus (RuDPCO, Transketolase, RPI) während der Entwicklung gemessen.

2) Im Endosperm waren von den aufgeführten Enzymen RuDPCO und Transketolase nicht nachweisbar. Bemerkenswert hoch ist die Aktivität der ADH. Die Enzyme der Glykolyse und des Pentosephosphat-Zyklus befinden sich nahezu ausschließlich in den Aleuronzellen, während Enzyme des TCC und des Aminosäurestoffwechsels auch im Stärkeendosperm vorhanden sind.

3) Die enzymatische Ausstattung der Organe des Embryos weist teils bedeutende Unterschiede auf. Es sind z.B. kennzeichnend für das Scutellum hohe Aktivität an ADH, für die Wurzel an GlDH, GOT, Aldolase, für den Sproß Enzyme des Calvin-Zyklus.

4) Im Embryo des trockenen Samens wurden bereits alle unter 1) genannten Enzyme gefunden außer RuDPCO und Transketolase; nur in Spuren nachweisbar sind RPI und GlDH. Diese Enzyme werden im Laufe der Keimung gebildet.

5) Von den untersuchten Enzymen läßt sich nur die Aktivität der Enzyme des Calvin-Zyklus (RuDPCO, RPI, Transketolase) durch Licht erhöhen. Es wird nachgewiesen, daß dieser Einfluß des Lichts unabhängig von einer Chlorophyllsynthese über das Phytochromsystem ausgeübt wird.

6) Die Proplastiden bilden auch bei Dunkelkeimlingen bereits eine Reihe von Thylakoiden aus. Stromabereich und Thylakoide werden durch Chloramphenicol sehr stark unterdrückt aber nicht der Prolamellarkörper.

7) Der Gehalt der Sprosse an pufferlöslichem Protein läßt sich durch Licht nicht signifikant steigern. Nur das unlösliche Protein ist nach Aufzucht im Dauerlicht erhöht.

8) RuDPCO wird während der Keimung auch bereits im Dunkeln

gebildet. Bei ihrem Auftreten wird der weitere Anstieg der Aktivität des Zwischenferments unterdrückt. Diese Hemmung läßt sich nicht durch Nährstoffmangel erklären und betrifft nur die G-6-PDH. Die Unterdrückung der Bildung von Zwischenferment muß daher auf einer spezifischen Regulation beruhen, die nur auf dieses Enzym ausgeübt wird.

9) Es wird wahrscheinlich gemacht, daß diese Kontrolle des Zwischenferments von Faktoren ausgeübt wird, die im Rahmen oder Gefolge des Calvin-Zyklus (repräsentiert durch RuDPCO) auftreten:

10) Die Bildung von Zwischenferment wird nicht gehemmt, wenn durch Wachstum bei tiefer Temperatur das Auftreten der RuDPCO unterbunden wird. Der Einfluß der tiefen Temperatur vermag die Aktivität des Zwischenferments aber nur zu erhöhen, wenn die Kälte vor dem Auftreten der RuDPCO einwirken kann. Der Einfluß der Kälte kann nicht als Vernalisationseffekt angesehen werden.

11) Die Zunahme der Aktivität der G-6-PDH läuft ebenfalls unbehindert linear weiter, wenn das Auftreten der RuDPCO durch Chloramphenicol verhindert wird. Durch andere Hemmstoffe, welche die RuDPCO nicht so vollständig und selektiv unterdrücken wie Chloramphenicol, läßt sich auch keine entsprechende Erhöhung der Aktivität des Zwischenferments erzielen.

12) Die Bedeutung des Pentosephosphat-Zyklus für das heterotrophe Wachstum und sein Verhältnis gegenüber dem Calvin-Zyklus werden diskutiert.

Literatur

ALBAUM, H.G., and PH.P. COHEN: Transamination and protein synthesis in germinating oat seedlings. J. Biol. Chem. 149, 19-27 (1943).

ANDERSON, D.G., H.A. STAFFORD, E.E. CONN, and B. VENNESLAND: The distribution in higher plants of triphosphopyridine nucleotide-linked enzyme systems capable of reducing glutathione. Plant Physiol. 27, 675-684 (1952).

AXELROD, B.: Pentose phosphate isomerase. In Methods in enzymology, ed. by COLOWICK and KAPLAN, Vol. I, 363-366 (1955).

AXELROD, B., and R.S. BANDURSKI: Oxidative metabolism of hexose phosphates by higher plants. Federation Proc. 11, 182 (1952).

BARNETT, R.C., H.A. STAFFORD, E.E. CONN, and B. VENNESLAND: Phosphogluconic dehydrogenase in higher plants. Plant Physiol. 28, 115-122 (1953).

BARTELS, H.: Enzymaktivitäten in ruhenden und keimenden Samen von Pinus nigra Arn.. Planta 55, 573-597 (1960).

BEEVERS, L., and R.H. HAGEMAN: The mechanism of induction of nitrate reductase in higher plants. Plant Physiol. 38, Suppl. XXXII (1963).

BERGMEYER, H.-U., Hrsg.: Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim 1962.

BERGMEYER, H.-U. u. E. BERNT: Malat-Dehydrogenase. S. 757-760
- u. - : Glutamat-Oxalacetat-Transaminase. S. 837- 845
- u. - : Glutamat-Pyruvat-Transaminase. S. 846- 853
jeweils in Methoden der enzymatischen Analyse, hrsg. von H.-U. BERGMEYER,(1962).

BERNFELD, P.: Amylases, and ß. In Methods in enzymology, ed. by COLOWICK and KAPLAN, Vol. I, 149-158 (1955).

BÖGER, P.: Das Strukturproteid aus Chloroplasten einzelliger Grünalgen und seine Beziehung zum Chlorophyll. Flora 154, 174-211 (1964).

BORTHWICK, H.A., S.B. HENDRICKS, E.H. TOOLE, and V.K. TOOLE: Action of light on lettuce-seed germination. Botan. Gaz. 115, 205-225 (1954).

BRIGGS, D.E.: Origin and distribution of α-amylase in malt. J. Inst. Brew. 70, 14-24 (1964).

BRUNS, F.H. u. H.-U. BERGMEYER: Fructose-1.6-diphosphat-Aldolase. In Methoden der enzymatischen Analyse, hrsg. von H.-U. BERGMEYER, 724-731 (1962).

BULEN, W.A.: The isolation and characterization of glutamic dehydrogenase from corn leaves. Arch. Biochem. Biophys. 62, 173-183 (1956).

BUTLER, W.L., and H.C. LANE: Dark transformations of phytochrome in vivo. II. Plant Physiol. 40, 13-17 (1965).

CHAKRAVORTY, M., and D.P. BURMA: Enzymes of the pentose phosphate pathway in the mung-bean seedling. Biochem. J. 73, 48-53 (1959).

CLAUSS, H., D.C. MORTIMER, and P.R. GORHAM: Time-course study of translocation of products of photosynthesis in soybean plants. Plant Physiol. 39, 269-273 (1964).

COLOWICK, S.P., and N.O. KAPLAN: Methods in enzymology. New York 1955 ff., Vol. I-VII.

CRUICKSHANK, D.H., and F.A. ISHERWOOD: Glutamic-alanine and glutamic-aspartic transaminases of wheat germ. Biochem. J. 69, 189-195 (1958).

CZOK, R. u. L. ECKERT: D-3-Phosphoglycerat, D-2-Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat. In Methoden der enzymatischen Analyse, hrsg. von H.-U. BERGMEYER, 224-233 (1962).

DAVIES, D.D.: The Krebs cycle enzyme system of pea seedlings. J. Exptl. Botany 4, 173-183 (1953).

DAVIS, B.D., CH. GILVARG, and S. MITSUHASHI: Enzymes of aromatic biosynthesis. In Methods in enzymology, ed. by COLOWICK and KAPLAN, Vol. II, 300-311 (1955).

DE DEKEN-GRENSON, M.: Grana formation and synthesis of chloroplastic proteins induced by light in portions of etiolated leaves. Biochim. Biophys. Acta 14, 203-211 (1954).

DURE, L.S.: Site of origin and extent of activity of amylases in maize germination. Plant Physiol. 35, 925-934 (1960).

ENGEL, CHR.: The distribution of the enzymes in resting cereals I. The distribution of the saccharogenic amylase in wheat, rye, and barley. Biochim. Biophys. Acta 1, 42-49 (1947).

FLORKIN, M., and E.H. STOTZ: Comprehensive biochemistry, Vol. 13, enzyme nomenclature. Amsterdam, London, New York 1965.

GANGULI, N.N.: Studies on the free amino acid composition of germinating Phaseolus radiatus. Naturwissenschaften 42, 18 (1955).

GIBBS, M.: Triosephosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the pea plant. Nature 170, 164 (1952).

GOKSÖYR, J., E. BOERI, and R.K. BONNICHSEN: The variation of ADH and catalase activity during the germination of the green pea (Pisum sativum). Acta Chem. Scand. 7, 657-662 (1953).

HAGEMAN, R.H., and D.I. ARNON: Changes in glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase during the life cycle of green plant. Arch. Biochem. Biophys. 57, 421-436 (1955).

-, and D. FLESHER: Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. Plant Physiol. 35, 700-708 (1960).

-, and -: The effect of an anaerobic environment on the activity of alcohol dehydrogenase and other enzymes of corn seedlings. Arch. Biochem. Biophys. 87, 203-209 (1960).

HALL, D.O., R.C. HUFFAKER, L.N. SHANNON, and A. WALLACE: Influence of light on dark carboxylation reactions in etiolated barley leaves. Biochim. Biophys. Acta 35, 540-542 (1959).

HASKINS, F.A.: Changes in the activities of several enzymes during germination and seedling development in corn (Zea mays L.). Plant Physiol. 30, 74-78 (1955).

HEBER, U.: Protein synthesis in chloroplasts during photosynthesis. Nature 195, 91-92 (1962).

-, H.G. PON, and M. HEBER: Localization of carboxydismutase & triosephosphate dehydrogenases in chloroplasts. Plant Physiol. 38, 355-360 (1963).

-, and J. WILLENBRINK: Sites of synthesis and transport of photosynthetic products within the leaf cell. Biochim. Biophys. Acta 82, 313-324 (1964).

HENSHALL, J.D., and T.W. GOODWIN: Amino acid-activating enzymes in germinating pea seedlings. Phytochemistry 3, 677-691 (1964).

HORECKER, B.L., J. HURWITZ, and P.K. STUMPF: The enzymatic synthesis of ribulose-1.5-diphosphate and xylulose-5-phosphate. In Methods in enzymology, ed. by COLOWICK and KAPLAN, Vol. III, 193-195 (1957).

-, and P.Z. SMYRNIOTIS: Transketolase from liver and spinach. In Methods in enzymology, ed. by COLOWICK and KAPLAN, Vol. I, 371-375 (1955).

HOTTA, Y., and H. STERN: Transient phosphorylation of deoxyribosides and regulation of deoxyribonucleic acid synthesis. J. Biophys. Biochem. Cytol. 11, 311-319 (1961).

HUFFAKER, R.C., R.B. OBENDORF, C.J. KELLER, and G. E. KLEINKOFF: In vivo light stimulation of carboxylative phase enzyme activities in greening barley seedlings. Plant Physiol. 39, Suppl. XIV (1964).

HURWITZ, J., A. WEISSBACH, B.L. HORECKER, and P.Z. SMYRNIOTIS: Spinach phosphoribulokinase. J. Biol. Chem. 218, 769-783 (1956).

HUTH, W.: Enzymatische Untersuchungen an Grünalgen bei verschiedenen Formen der Kohlenstoffernährung. Dissertation, Göttingen 1965.

JAKOBY, W., D.O. BRUMMOND, and S. OCHOA: Formation of 3-phosphoglyceric acid by carbon dioxide fixation with spinach leaf enzymes. J. Biol. Chem. 218, 811-822 (1956).

JENSEN, W.A.: The histochemical localization of peroxidase in roots and its induction by indolacetic acid. Plant Physiol. 30, 426-432 (1955).

KORNBERG, A.: Lactic dehydrogenase of muscle. In Methods in enzymology, ed. by COLOWICK and KAPLAN, Vol. I, 441-443 (1955).

LANDGRAF, J.E.: Über den Einfluß des Lichtes auf den Proteinstoffwechsel bei Keimlingen von Sinapis alba L.. Planta 57, 543-556 (1961).

LATZKO, E. u. J.P. KOTZÉ: Enzymmuster von keimender Sommergerste. Naturwissenschaften 52, 111 (1965).

LOHR, G.W. u. H.D. WALLER: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Zwischenferment). In Methoden der enzymatischen Analyse, hrsg. von H.-U. BERGMEYER, 744-751 (1962).

MARCUS, A.: Photocontrol of formation of red kidney bean leaf triphosphopyridine nucleotide linked triosephosphate dehydrogenase. Plant Physiol. 35, 126-128 (1960).

-, and J. FEELEY: Activation of protein synthesis in the imbibition phase of seed germination. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51, 1075-1079 (1964).

MARGULIES, M.M.: Effect of chloramphenicol on light-dependent synthesis of proteins and enzymes of leaves and chloroplasts of Phaseolus vulgaris var. Black Valentine. Plant Physiol. 39, 579-585 (1964).

- : Relationship between red light mediated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase formation and light dependent development of photosynthesis. Plant Physiol. 40, 57-61 (1965).

MAYER, A.M., and A. POLJAKOFF-MAYBER: The germination of seeds. Oxford, London, New York, Paris 1963.

NEGO, J.L., and A.T. JAGENDORF: Effect of light on growth of Black Valentine bean plastids. Biochim. Biophys. Acta 53, 237-254 (1961).

MOHR, H.: Der Einfluß monochromatischer Strahlung auf das Längenwachstum des Hypocotyls und auf die Anthocyanbildung bei Keimlingen von Sinapis alba L. (= Brassica alba Boiss.). Planta 49, 389-405 (1957).

- : Der Lichteinfluß auf die Haarbildung am Hypokotyl von Sinapis alba L.. Planta 53, 109-124 (1959).

- : Der Lichteinfluß auf das Wachstum der Keimblätter bei Sinapis alba L.. Planta 53, 219-245 (1959).

- u. U. APPUHN: Die Keimung von Lactuca-Achänen unter dem Einfluß des Phytochromsystems und der Hochenergiereaktion der Photomorphogenese. Planta 60, 274-288 (1963).

- u. H. LANGE: Die Hemmung der lichtinduzierten Anthocyansynthese durch Actinomycin D. Naturwissenschaften 52, 261 (1965).

MOHR, H. u. E. VAN NES: Der Einfluß sichtbarer Strahlung auf die Flavonoid-Synthese und Morphogenese der Buchweizen-Keimlinge (Fagopyrum esculentum Moench.),I. Synthese von Anthocyan. Z. Botan. 51, 1-16 (1963).

MOLOTSKOVSKY, J.G. u. V.F. MORIAKOVA: The role of nucleic acids and protein in induced chlorophyll biosynthesis. Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol. 28, 719-723 (1963). Nach Ber. wiss. Biol. 213, 106 (1964).

MOTHES, K. u. L. ENGELBRECHT: Über den Stickstoffumsatz in Blattstecklingen. Flora 143, 428-472 (1956).

OOTA, Y., Y. YAMAMOTO, and R. FUJII: Dehydrogenase pattern in bean seed embryo. J. Biochem. 40, 187-203 (1953).

PAIGEN, K.: Changes in the inducibility of galactokinase and ß-galactosidase during inhibition of growth in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 77, 318-328 (1963).

PALEG, L.G.: Physiological effects of gibberellic acid. II. On starch hydrolyzing enzymes of barley endosperm. Plant Physiol. 35, 902-906 (1960).

PÄTAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen. Eine neue t-Tafel. Biol. Zentr. 63, 152-168 (1943).

RACKER, E.: Alcohol dehydrogenase from baker's yeast. In Methods in enzymology, ed. by COLOWICK and KAPLAN, Vol. I., 500-503 (1955).

- : Ribulose diphosphate carboxylase from spinach leaves. In Methods in enzymology, ed. by COLOWICK and KAPLAN, Vol. V., 266-270 (1962).

- : D-Xylulose-5-phosphate 3-epimerase from muscle. In Methods in enzymology, ed. by COLOWICK and KAPLAN, Vol. V., 280-282 (1962).

Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry 1961. I.U.B. ser., Vol. 20, Oxford, London, New York, Paris 1961.

RIJVEN, A.H.G.C., and R. COHEN: Distribution of growth and enzyme activity in the developing grain of wheat. Australian J. Biol. Sci. 14, 552-566 (1961).

ROBERTS, E.H.: The distribution of oxidation-reduction enzymes and the effects of respiratory inhibitors and oxidizing agents on dormancy in rice seed. Physiol. Plantarum 17, 14-29 (1964).

ROBINSON, E., and R. BROWN: The development of the enzyme complement in growing root cells. J. Exptl. Botany 2, 356-374 (1952).

ROSE, Z.B.: Studies on the mechanism of action of isocitric dehydrogenase. J. Biol. Chem. 235, 928-933 (1960).

SCHMIDT, E.: Glutamat-Dehydrogenase. In Methoden der enzymatischen Analyse, hrsg. von H.-U. BERGMEYER, 752-756 (1962).

SEN, N.P., and A.D. ROBINSON: The absence of thiamine phosphates from cereals. Can. J. Biochem. Physiol. 41, 97-100 (1963).

SHUSTER, L., and R.H. GIFFORD: Changes in 3'-nucleotidase during the germination of wheat embryos. Arch. Biochem. Biophys. 96, 534-540 (1962).

SIMON, H., H.-D. DORRER u. A. TREBST: Photosyntheseversuche in Tritiumwasser mit Chlorella. Z. Naturforschg. 19b, 734-744 (1964).

SMITH, B.P., and H.H. WILLIAMS: Transaminase studies in germinating seeds. Arch. Biochem. Biophys. 31, 366-374 (1951).

STREET, H.V.: Amylase. In Methoden der enzymatischen Analyse, hrsg. von H.-U. BERGMEYER, 854-858 (1962).

SYPHERD, P.S., N. STRAUSS, and H.P. TREFFERS: The preferential inhibition by chloramphenicol of induced enzyme synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 477-481 (1962).

TOLBERT, N.E., and F.B. GAILEY: Carbon dioxide fixation by etiolated plants after exposure to white light. Plant Physiol. 30, 491-499 (1955).

VARNER, J.E.: Gibberellic acid controlled synthesis of α-amylase in barley endosperm. Plant Physiol. 39, 413-415 (1964).

-, and G.R. CHANDRA: Hormonal control of enzyme synthesis in barley endosperm. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 52, 100-106 (1964).

VENNESLAND, B.: Conversion of P-pyruvate to oxalacetate (plant). In Methods in enzymology, ed. by COLOWICK and KAPLAN, Vol. V., 617-622 (1962).

WANKA, F., I.K. VASIL, and H. STERN: Thymidine kinase: the dissociability and its bearing on the enzyme activity in plant materials.
Biochim. Biophys. Acta 85, 50-59 (1964).

WILLIS, J.E., and H.J. SALLACH: Serine biosynthesis from hydroxypyruvate in plants.
Phytochemistry 2, 23-28 (1963).

Anhang

1. Verzeichnis der Abkürzungen:

ADH Alkohol-Dehydrogenase; ATP Adenosin-5'-Triphosphat; DR Dunkelrot (726 m/u); DSSR 5-Dehydroshikimisäure-Reduktase; EDTA Äthylendiamintetraessigsäure; F-6-P Fructose-6-phosphat; GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; GDH/TIM Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase/Triosephosphat-Isomerase; GlDH Glutamat-Dehydrogenase; GOT Glutamat-Oxalacetat-Transaminase; G-6-P Glucose-6-phosphat; G-6-PDH Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; GPT Glutamat-Pyruvat-Transaminase; GSH Glutathion; HR Hellrot (661 m/u); ICDH Isocitrat-Dehydrogenase; α-KGS α-Ketoglutarsäure; LDH Lactat-Dehydrogenase; MDH Malat-Dehydrogenase; NAD, NADH oxydiertes bzw. reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid; NADP Nicotinamid-adenindinucleotid-phosphat; PEP Phosphoenol-pyruvat; PEPCO Phosphoenol-pyruvat-Carboxylase; PGK Phosphoglycerat-Kinase; 6-PGS 6-Phosphogluconsäure; 6-PGSDH 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase; R-5-P Ribose-5-phosphat; RPI Ribosephosphat-Isomerase; RuDP Ribulose-1,5-diphosphat; RuDPCO Ribulosediphosphat-Carboxylase; TCC Tricarbonsäure-Zyklus; TPP Thiamin-pyrophosphat; Tris Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan; Xu-5-P Xylulose-5-phosphat;

2. Enzymtests

Außer bei den Amylasen und der RPI wurden die Aktivitäten der untersuchten Enzyme im optischen Test nach Warburg bestimmt. Die Messung wurde bei 366 m/u im Photometer "Eppendorf" vorgenommen.

Die Aktivitäten werden als m/uM bzw. /uM umgesetztes Substrat pro min angegeben. Die sogen. "absoluten" Aktivitäten sind auf die Stückzahl, z.B. einen Embryo oder ein Organ, bezogen (m/uM/min x Stück), die spezifischen Aktivitäten auf das Extraktprotein (m/uM/min x mg Protein). Die Angabe der Aktivität bei den Amylasen und der RPI wird bei dem entsprechenden Testgemischen behandelt. Die Durchführung aller Fermenttests erfolgte nach Vorinkubation (wenn nicht

anders angegeben, von ca. 5 min) bei 25°. Die bei 366 m/u gemessenen Testansätze wurden so beschickt, daß die Änderung der optischen Dichte E in der min einen Wert von 0,030 nicht überschritt.

Neben den gebräuchlichen Trivialnamen werden die von der Enzyme Commission eingeführten systematischen Namen und Nummern der Enzyme in Klammern angegeben (nach Report of the Commission on Enzymes 1961 und FLORKIN and STOTZ, Comprehensive Biochemistry, Bd. 13, 1965).

α-Amylase
(3.2.1.1 α-1,4-Glucan 4-glucanohydrolase)
Test modifiziert nach SHUSTER u. GIFFORD 1962:

1,0 ml 0,016 N Na-Acetatpuffer, pH 5,0, der 0,6 mg Amylose pro ml enthält (Herstellung der Amylose-Stammlösung nach STREET 1962).
0,9 ml H_2O
0,1 ml Extrakt (in Blindprobe H_2O)

3 min Inkubation. Stop durch 1 ml J-HCl-Lsg. (60 mg KJ + 6 mg J_2 in 100 ml 0,05 N HCl). 5 ml H_2O zufügen.
Es wurden die Extinktionen bei 620 m/u bestimmt und die Abnahme der Extinktion gegenüber der Blindprobe ermittelt. Mit Hilfe eines Eichwertes wurde die Aktivität in mg umgesetzte Amylose/min x Stück bzw. mg Protein umgerechnet.

Gesamtamylase (vorwiegend ß-Amylase)
Test nach BERNFELD 1955
Die Farbreaktion wurde bei 546 m/u gemessen. Nach einer Eichkurve für Maltose werden die Aktivitäten angegeben als mg gebildete Maltose/min x Stück bzw. mg Protein.

Aldolase
(4.1.2.13 Fructose-1,6-diphosphate D-glyceraldehyde-3-phosphate-lyase).
Bestimmung nach BRUNS u. BERGMEYER 1962

Alkohol-Dehydrogenase
(1.1.1.1 Alcohol:NAD oxidoreductase)
Bestimmung nach RACKER 1955

2,2	ml H_2O
0,5	ml 0,06 M Na-Pyrophosphat-Puffer, pH 8,5
0,1	ml 3 M Äthanol
0,1	ml 0,015 M NAD

Start durch 0,1 ml Extrakt

Lactat-Dehydrogenase
(1.1.1.27 L-Lactate:NAD oxidoreductase)
Bestimmung in Anlehnung an KORNBERG 1955

1,65	ml H_2O
1,0	ml 0,1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7,6
0,05	ml 7 x 10^{-3} M NADH
0,2	ml Extrakt
0,1	ml 0,01 M Na-Pyruvat zum Start

Isocitrat-Dehydrogenase
(1.1.1.42 threo-D_S-Isocitrate:NADP oxidoreductase
(decarboxylating))
Modifizierter Test nach ROSE 1960

0,85	ml 0,05 M K-Phosphat-Puffer, pH 7,6
0,02	ml 0,2 M $MgCl_2$ x 6 H_2O
0,03	ml 3 x 10^{-3} M NADP
0,05	ml Extrakt
0,05	ml 0,15 M Na-Isocitrat zum Start

Malat-Dehydrogenase
(1.1.1.37 L-Malate:NAD oxidoreductase)
Test nach BERGMEYER u. BERNT 1962, aber bei pH 7,6

Phosphoenol-pyruvat-Carboxylase
(4.1.1.31 Orthophosphate:oxaloacetate carboxy-lyase
(phosphorylating))
Modifizierter Test nach VENNESLAND 1962

1,4 ml H_2O
1,0 ml 0,12 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, der 4,2 mg $NaHCO_3$/ml enthält.
0,1 ml 0,14 M PEP (tri-Cyclohexylammoniumsalz); in der Blindprobe: H_2O
0,2 ml 0,2 M GSH (frisch neutralisiert)
0,1 ml 0,04 M $MgCl_2$ x 6 H_2O
0,05 ml 1,2 x 10^{-2} M NADH
0,05 ml MDH (0,5 mg/ml)
Start durch 0,1 ml Extrakt

Glutamat-Dehydrogenase
(1.4.1.2 L-Glutamate:NAD oxidoreductase (deaminating))
Test nach SCHMIDT 1962
1,66 ml 0,05 M Triäthanolamin-Puffer, pH 8,0 + 4 x 10^{-3} M EDTA (in Blindprobe: 1,7 ml; dafür ohne α-KGS)
0,03 ml 1,5 x 10^{-2} M NADH
0,07 ml 3,0 M Ammoniumacetat
0,2 ml Extrakt
nach 15 min Vorinkubation Start durch 0,04 ml 0,4 M α-KGS (mit NaOH auf pH 6,8 gebracht)

Glutamat-Pyruvat-Transaminase
(2.6.1.2 L-Alanine:2-oxoglutarate aminotransferase)
Test nach BERGMEYER u. BERNT 1962
2,7 ml 0,1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7,5, + 0,11 M L-Alanin
0,05 ml 1,2 x 10^{-2} M NADH
0,05 ml LDH (0,5 mg/ml; $(NH_4)^+$-frei dialysiert, in 50 %igem Glyzerin)
0,1 ml Extrakt
nach 15 min Vorinkubation Start mit 0,1 ml 0,2 M α-KGS (mit NaOH auf pH 6,8 neutralisiert)

Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
(2.6.1.1 L-Aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase)
Modifizierter Test nach BERGMEYER u. BERNT 1962

2,7 ml 0,05 M Triäthanolamin + 1,5 x 10^{-1} M Na-L-Asparaginat, pH 8,0; außerdem 0,01 mg Pyridoxalphosphat pro ml enthaltend
0,05 ml 1,2 x 10^{-2} M NADH
0,05 ml MDH (0,5 mg/ml; $(NH_4)^+$-frei dialysiert, in 50 %igem Glyzerin)
0,1 ml Extrakt
nach 15 min Vorinkubation Start durch 0,1 ml 0,2 M α-KGS (mit NaOH auf pH 6,8 neutralisiert)

5-Dehydroshikimisäure-Reduktase
(1.1.1.25 Shikimate:NADP oxidoreductase)
Test in Anlehnung an DAVIS et al. 1955
0,85 ml H_2O
0,3 ml 1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,0
0,3 ml 0,1 M EDTA-KOH, pH 8,0
0,05 ml 3 x 10^{-2} M NADP
0,1 ml Extrakt
0,4 ml 0,01 M Shikimisäure (neutralisiert) zum Start

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Zwischenferment
(1.1.1.49 D-Glucose-6-phosphate:NADP oxidoreductase)
Bestimmung nach LÖHR u. WALLER 1962
2,7 ml 0,05 M Triäthanolamin + 4 x 10^{-3} M EDTA, pH 8,0
0,05 ml 3 x 10^{-2} M NADP
0,2 ml Extrakt
0,05 ml 4 x 10^{-2} M G-6-P zum Start

6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase
(1.1.1.44 6-Phospho-D-gluconate:NADP oxidoreductase (decarboxylating))
Ansatz wie G-6-PDH außer: 2,65ml Puffer und Start mit 0,1 ml 2 x 10^{-2} M 6-PGS (tri-Cyclohexylammoniumsalz) als Substrat

Ribosephosphat-Isomerase
(5.3.1.6 D-Ribose-5-phosphate ketol-isomerase)
Test nach AXELROD 1955

Die Aktivität wird in relativem Maß angegeben als Extinktionszunahme gegenüber dem Blindwert mal 10^3, die nach 10 min Reaktion durch 0,1 ml eines Extraktes bedingt wird, der pro ml 1 Embryo bzw. 1 Sproß enthält. (Messung der Carbazolreaktion nach genau 30 min Farbentwicklung bei 25° bei 546 mμ)

Transketolase
(2.2.1.1 Sedoheptulose-7-phosphate:D-glyceraldehyde-3-phosphate glycolaldehydetransferase)
Modifizierter Testansatz nach HORECKER u. SMYRNIOTIS 1955

0,755	ml	H_2O
0,05	ml	0,5 M Glycylglycin-Puffer, pH 7,6
0,01	ml	0,2 M $MgCl_2$ x 6 H_2O + 10^{-3} M TPP
0,02	ml	4 x 10^{-3} M NADH
0,06	ml	0,1 M Cysteinhydrochlorid, pH 7,6 (frisch neutralisiert)
0,005	ml	GDH/TIM (2 mg/ml)
0,05	ml	Extrakt
0,05	ml	R-5-P/Xu-5-P (1 vol. 3 % R-5-P + 2 vol. 3 % Xu-5-P) zum Start

Ribulosediphosphat-Carboxylase, Carboxydismutase
(4.1.1.39 3-Phospho-D-glycerate carboxy-lyase (dimerizing))
Die Bestimmung der Aktivität wurde in Anlehnung an RACKER 1962 durchgeführt. Nach Stop der Reaktion wurde die gebildete 3-Phosphoglycerinsäure enzymatisch bestimmt.
Testansatz:

0,41	ml	H_2O
0,05	ml	1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,8
0,05	ml	0,1 M Cystein (frisch neutralisiert auf pH 7,6)
0,02	ml	0,5 M $MgCl_2$ x 6 H_2O
0,15	ml	0,5 M $KHCO_3$
0,2	ml	Extrakt

nach 10 min Vorinkubation Start durch 0,02 ml 1 % RuDP; nach 10 min Reaktion Stop durch 0,1 ml 1 N HCl, 1,5 min in siedendem Wasser erhitzen, abkühlen, zentrifugieren. In der

Blindprobe wurde bei gleichem Ansatz RuDP erst nach der HCl zugegeben.

Bestimmung der 3-Phosphoglycerinsäure, modifiziert nach CZOK u. ECKERT 1962

1,16	ml H_2O
0,4	ml 1 M Tris-HCl, pH 7,8
0,03	ml 0,5 M $MgCl_2$ x 6 H_2O
0,05	ml Cystein (wie oben)
0,06	ml 0,2 M ATP
0,04	ml 1,2 x 10^{-2} M NADH
0,02	ml GDH/TIM (2 mg/ml)
0,04	ml GAPDH (10 mg/ml)
0,2	ml Probe des Testansatzes

20 min Vorinkubation; Ablesen der Extinktion E_1, Start der Reaktion durch 0,002 ml PGK (10 mg/ml), nach 15 min Extinktion E_2 ablesen.

Die Präparation der Substrate RuDP und Xu-5-P erfolgte nach HORECKER, HURWITZ u. STUMPF 1957. Die dafür benötigte Phosphoribose-Isomerase wurde nach HURWITZ, WEISSBACH, HORECKER, SMYRNIOTIS 1956, die Phosphoribulo-Kinase nach JAKOBY, BRUMMOND, OCHOA 1956 und die Xylulose-5-phosphat-3-Epimerase nach RACKER 1962 gewonnen.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. A. Pirson, danke ich für die Anregung dieser Arbeit und für seine stete ermutigende Anteilnahme an ihrem Fortgang.
Fräulein Dr. Chr. Berger sei an dieser Stelle für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Sachbeihilfen gedankt.

Lebenslauf

Am 24. Oktober 1938 wurde ich als Sohn des Maschinenschlossers Gerhard Feierabend und seiner Ehefrau Margarete in Danzig geboren. Die Grundschule besuchte ich zunächst 1944 in Danzig und ab 1945 in Bremerhaven. 1949 wurde ich in das Wilhelm-Raabe-Gymnasium in Bremerhaven aufgenommen und legte 1958 am altsprachlichen Zweig dieser Schule das Abitur ab. Im Sommersemester 1958 begann ich das Studium der Biologie an der Universität Göttingen. Im Sommersemester 1961 studierte ich an der Universität Tübingen und setzte im Wintersemester 1961/62 mein Studium in Göttingen fort, wo ich im Wintersemester 1962/63 am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität bei Herrn Prof. Dr. Pirson meine Doktorarbeit begann.
Meine akademischen Lehrer in den Hauptfächern waren: Professor Ax, Professor Birukow, Professor Brockmann, Professor Firbas, Professor Glemser, Professor Piepho, Professor Pirson, Professor Trebst, Professor Schlegel in Göttingen und Professor Bünning in Tübingen.

BAMBERGER FOTODRUCK · Rudolf Rodenbusch